

PCT/JP2004/012238

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

19.08.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 7月29日

出願番号
Application Number: 特願2004-222441

[ST. 10/C]: [JP2004-222441]

REC'D	07 OCT 2004
WIPO	PCT

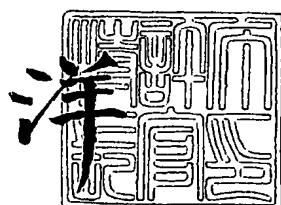
出願人
Applicant(s): タカラバイオ株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 9月24日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2004-3085985

【書類名】 特許願
【整理番号】 T-1903
【提出日】 平成16年 7月29日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 5/00
 C12N 5/08
 A61K 35/00

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 出野 美津子

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 村木 信子

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 小川 衣子

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 岸本 真幸

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 榎 竜嗣

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 佐川 裕章

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】
【識別番号】 302019245
【氏名又は名称】 タカラバイオ株式会社
【代表者】 加藤 郁之進

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 173212
【納付金額】 16,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

培地中における血清および血漿の総含有濃度が0～5%未満である培地を用いて、フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養から選択される少なくとも1つを行う工程を含むことを特徴とする、細胞傷害性リンパ球の製造方法。

【請求項2】

細胞傷害性リンパ球が、フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を含まない培地を用いて製造されたものと比較して、インターロイキン-2レセプターを高発現するものである請求項1記載の方法。

【請求項3】

細胞傷害性リンパ球が、フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を含まない培地を用いて製造されたものと比較して、CD8陽性細胞を高比率で含有するものである請求項1記載の方法。

【請求項4】

フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を含まない培地を用いた細胞傷害性リンパ球の製造方法と比較して、拡大培養率が高い方法である請求項1記載の方法。

【請求項5】

細胞傷害性リンパ球が、フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を含まない培地を用いて製造されたものと比較して、細胞傷害活性が増強されたもしくは高い細胞傷害活性が維持されたものである請求項1～4に記載の方法。

【請求項6】

フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物が固相に固定化されてなるものである請求項1～5いずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

固相が細胞培養用器材または細胞培養用担体である請求項6記載の方法。

【請求項8】

細胞培養用器材がシャーレ、フラスコまたはバッグであり、細胞培養用担体がビーズ、メンブレンまたはスライドガラスである請求項7記載の方法。

【請求項9】

細胞傷害性リンパ球がリンフォカイン活性化キラー細胞である請求項1～8いずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

フィプロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号1～7で表されるアミノ酸配列を少なくとも1つ含んでなるポリペプチドであるか、または前記ポリペプチドのアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、前記ポリペプチドと同等な機能を有するポリペプチドである請求項1～9いずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

フィプロネクチンのフラグメントが、細胞接着活性および/またはヘパリン結合活性を有するものである請求項10記載の方法。

【請求項12】

フィプロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号8～19で表されるアミノ酸配列のいずれかからなるポリペプチドより選択されるポリペプチドである請求項10記載の方法。

【請求項13】

細胞培養用器材中で行なう請求項1記載の方法であって、
(a) 培養開始時の細胞数と細胞培養用器材における培養面積との比率が、1 cell/cm²～5×10⁵ cells/cm²である、および/または

(b) 培養開始時の培地中の細胞の濃度が、 $1 \text{ cell}/\text{ml} \sim 5 \times 10^5 \text{ cells}/\text{ml}$ である、の条件を満たす方法。

【請求項14】
細胞培養液を希釈する工程を包含しない請求項13記載の方法。

【請求項15】
細胞傷害性リンパ球の誘導、維持及び拡大培養の少なくともいずれか1つを、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下、培地を含む細胞培養用器材中で行なう請求項1記載の方法であって、少なくとも1回の細胞培養液を希釈する工程、培地を交換する工程もしくは細胞培養用器材を交換する工程を包含し、かつ少なくとも1回の細胞培養液を希釈する工程直後、培地を交換する工程直後もしくは細胞培養用器材を交換する工程直後の培養条件が

(c) 培養液中の細胞の濃度が $2 \times 10^5 \text{ cells}/\text{ml} \sim 1 \times 10^8 \text{ cells}/\text{ml}$ である、もしくは

(d) 細胞培養用器材における培養面積との比率が $1 \times 10^5 \text{ cells}/\text{cm}^2 \sim 1 \times 10^8 \text{ cells}/\text{cm}^2$ である
のいずれかの条件を満たす方法。

【請求項16】
細胞傷害性リンパ球の誘導、維持及び拡大培養の少なくともいずれか1つを、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下、培地を含む細胞培養用器材中で行なう請求項1記載の方法であって、少なくとも1回の細胞培養液を希釈する工程、培地を交換する工程もしくは細胞培養用器材を交換する工程を包含し、かつ少なくとも1回の細胞培養液を希釈する工程直後、培地を交換する工程直後もしくは細胞培養用器材を交換する工程直後における培地中における血清および血漿の総含有濃度が培養開始時よりも低減されている請求項1記載の方法。

【請求項17】
請求項1～16いずれか1項に記載の方法により得られる細胞傷害性リンパ球。

【請求項18】
請求項1～16いずれか1項に記載の方法により得られる細胞傷害性リンパ球を有効成分として含有する医薬。

【請求項19】
フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を有効成分として含有し、かつ血清および血漿の濃度が0～5%未満であることを特徴とする細胞傷害性リンパ球培養用培地。

【請求項20】
細胞傷害性リンパ球に外来遺伝子を導入する工程をさらに含む請求項1～16いずれか1項に記載の方法。

【請求項21】
外来遺伝子をレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはシミアンウイルスを用いて導入する請求項20記載の方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】細胞傷害性リンパ球の製造方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、医療分野において有用な、細胞傷害性リンパ球を取得する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

生体は主として免疫応答により異物から守られており、免疫システムはさまざまな細胞とそれが作り出す可溶性の因子によって成り立っている。なかでも中心的な役割を果たしているのが白血球、特にリンパ球である。このリンパ球はBリンパ球（以下、B細胞と記載することがある）とTリンパ球（以下、T細胞と記載することがある）という2種類の主要なタイプに分けられ、いずれも抗原を特異的に認識し、これに作用して生体を防御する。

【0003】

T細胞は、CD (Cluster Designation) 4マーカーを有し、主に抗体産生の補助や種々の免疫応答の誘導に関するヘルパーT細胞（以下、T_Hと記載する）、CD8マーカーを有し、主に細胞傷害活性を示す細胞傷害性T細胞 [Tc；細胞傷害性Tリンパ球 (cytotoxic T lymphocyte)]、キラーT細胞とも呼ばれる。以下、CTLと記載することがある] に亜分類される。腫瘍細胞やウイルス感染細胞等を認識して破壊、除去するのに最も重要な役割を果たしているCTLは、B細胞のように抗原に対して特異的に反応する抗体を産生するのではなく、標的細胞膜表面上に存在する主要組織適合複合体 [MHC；ヒトにおいてはヒト白血球抗原 (HLA) と称することもある] クラスI分子に会合した標的細胞由来の抗原 (抗原ペプチド) を直接認識して作用する。この時、CTL膜表面のT細胞レセプター（以下、TCRと称す）が前述した抗原ペプチドおよびMHCクラスI分子を特異的に認識して、抗原ペプチドが自己由来のものなのか、あるいは、非自己由来のものなのかを判断する。そして、非自己由来と判断された標的細胞はCTLによって特異的に破壊、除去される。

【0004】

近年、薬剤治療法や放射線治療法のように患者に重い肉体的負担がある治療法が見直され、患者の肉体的負担が軽い免疫治療法への関心が高まっている。特に免疫機能が正常なヒト由来のリンパ球から目的とする抗原に対して特異的に反応するCTLを生体外 (イン・ビトロ、in vitro) で誘導した後、もしくは誘導を行わず、リンパ球を拡大培養し、患者へ移入する養子免疫療法の有効性が注目されている。例えば、動物モデルにおいて養子免疫療法がウイルス感染および腫瘍に対して有効な治療法であることが示唆されている（例えば、非特許文献1及び非特許文献2）。この治療法ではCTLの抗原特異的傷害活性を維持もしくは増強させた状態でその細胞数を維持あるいは増加させることが重要である。

【0005】

上記のような養子免疫療法において、治療効果を得るために一定量以上の細胞数の細胞傷害性リンパ球を投与する必要がある。すなわち、イン・ビトロでこれらの細胞数を短時間に得ることが最大の問題であるといえる。

【0006】

CTLの抗原特異的傷害活性を維持および増強するためには、CTLについて抗原に特異的な応答を誘導する際に、目的とする抗原を用いた刺激を繰り返す方法が一般的である。しかし、通常、この方法では最終的に得られるCTL数が減少し、十分な細胞数が得られない。

【0007】

疾病の治療に有効なT細胞を調製する方法としては、例えば、リンフォカイン活性化キラー細胞 (LAK細胞) を用いる養子免疫療法（例えば、非特許文献3）、高濃度のインターロイキン-2 (IL-2) を用いて誘導した腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を用いる養

子免疫療法（例えば、非特許文献4および非特許文献5）が知られている。

【0008】

次に、抗原特異的なCTLの調製に関しては、自己CMV感染線維芽細胞とIL-2（例えば、非特許文献6）、あるいは抗CD3モノクローナル抗体（抗CD3mAb）とIL-2を用いて、それぞれCMV特異的CTLクローンを単離ならびに大量培養する方法（例えば、非特許文献7）が報告されている。

【0009】

さらに、特許文献1にはREM法（rapid expansion method）が開示されている。このREM法は、抗原特異的CTLおよびTHを含むT細胞の初期集団を短期間で増殖（expand）させる方法である。つまり、個々のT細胞クローンを増殖させて大量のT細胞を提供可能であり、抗CD3抗体、IL-2、並びに放射線照射により増殖性をなくしたPBMC（peripheral blood mononuclear cell、末梢血単核細胞）とエプスタイン-バールウイルス（Epstein-Barr virus、以下EBVと略す）感染細胞とを用いて抗原特異的CTL数を増加させることが特徴である。

【0010】

また、特許文献2には改変REM法が開示されており、当該方法はPBMCとは区別されるT細胞刺激成分を発現する分裂していない哺乳動物細胞株をフィーダ細胞として使用し、PBMCの使用量を低減させる方法である。

【0011】

リンフォカイン活性化キラー細胞（LAK細胞）は、リンパ球を含む末梢血液（末梢血白血球）や臍帯血、組織液等にIL-2を加えて、数日間試験管内で培養することにより得られる細胞傷害活性を持つ機能的細胞集団である。この際、抗CD3抗体を加えて培養することにより、さらにLAK細胞の増殖は加速する。このようにして得られたLAK細胞は非特異的にさまざまがん細胞やその他のターゲットに対して傷害活性を有する。LAK細胞も上記CTLと同様に、養子免疫療法に使用される。

【0012】

上記のとおり、細胞傷害性リンパ球、例えばCTL、LAK細胞、TIL等を取得する工程においてはIL-2の利用を欠かすことができない。IL-2が細胞表面のインターロイキン-2レセプター（IL-2R）に結合することにより細胞はさらに活性化される。また、IL-2Rはリンパ球の活性化マーカーとして知られている。これらの点において、細胞表面のIL-2Rの発現を上昇させることは重要である。また、CTLの誘導においては、抗原による刺激に供されたCTLの前駆細胞がCTLとして誘導される効率を向上させること、すなわち、誘導後の細胞群におけるCD8陽性細胞の割合（比率）を向上させることが重要である。

【0013】

またこれらリンパ球を体外において拡大培養する際には通常血清または血漿が5%から20%添加される。この血清・血漿はリンパ球等の細胞をイン・ビトロで培養する際に必要とされる成分であるが、血清・血漿は非自己動物（ヒト・ウシ等）の血液をその由来とするため各種ウイルス感染等の危険性が排除できない。また、現在の検出技術では検出することができないようなウイルス・病原性微生物の存在を完全否定することは不可能である。

【0014】

この観点から、近年、患者由来の血清・血漿（自己血清・血漿）の使用が進められている。しかし、培養に必要な量の血清・血漿を確保するために疾患患者自身の血液を多量に採取することは、患者への肉体的負担が大きく、生命の危険につながる可能性もある。この危険を回避するため、少量の血清・血漿を用いて、治療に必要なリンパ球を得る拡大培養を行うと必然的に低濃度血清・血漿での培養となる。一般にリンパ球等の細胞は低血清・低血漿条件における培養では増殖が不安定となり治療に必要な量の細胞が得られない。さらに、上述の肉体的負担および感染の危険性を回避するためには無血清培養が強く求め

られるが、このような培養条件ではほとんどの細胞が増殖しなくなる。

【0015】

このため、低血清・無血清（低血漿・無血漿）でのリンパ球拡大培養方法が強く求められている。

【0016】

無血清（無血漿）条件下でのリンパ球拡大培養方法が確立されれば、血清・血漿のロット間の差を排除でき、疾患患者血清・血漿に由来する負要因（免疫抑制成分等）を排除することが出来ることから、この系の確立によって得られる利益は計り知れない。

【0017】

フィプロネクチンは動物の血液中、培養細胞表面、組織の細胞外マトリックスに存在する分子量25万の巨大な糖タンパク質であり、多彩な機能を持つことが知られている。そのドメイン構造は7つに分けられており（以下、図1参照）、またそのアミノ酸配列中には3種類の類似の配列が含まれており、これら各配列の繰返しで全体が構成されている。3種類の類似の配列はI型、II型、III型と呼ばれ、このうち、III型はアミノ酸残基71～96個のアミノ酸残基で構成されており、これらのアミノ酸残基の一致率は17～40%である。フィプロネクチン中には14のIII型の配列が存在するが、そのうち、8番目、9番目、10番目（以下、それぞれIII-8、III-9、III-10と称する。）は細胞結合ドメインに、また12番目、13番目、14番目（以下、それぞれIII-12、III-13、III-14と称する。）はヘパリン結合ドメインに含まれている。また、III-10にはVLA（very late activation antigen）-5結合領域が含まれており、このコア配列はRGDSである。また、ヘパリン結合ドメインのC末端側にはIICCSと呼ばれる領域が存在する。IICCSには25アミノ酸からなるVLA-4に対して結合活性を有するCS-1と呼ばれる領域が存在する（例えば、非特許文献8、非特許文献9および非特許文献10）。

【0018】

【非特許文献1】Greenberg, P. D. 著, 1992年発行, Advances in Immunology

【非特許文献2】Reusser P. 他3名, Blood, 1991年, Vol. 78, No. 5, P1373～1380

【非特許文献3】Rosenberg S. A. 他, N. Engl. J. Med. 1987年, Vol. 316, No. 15, P889～897

【非特許文献4】Rosenberg S. A. 他, N. Engl. J. Med. 1988年, Vol. 319, No. 25, P1676～1680

【非特許文献5】Ho M. 他9名, Blood, 1993年, Vol. 81, No. 8, P2093～2101

【非特許文献6】Riddell S. A. 他4名, J. Immunol., 1991年, Vol. 146, No. 8, P2795～2804

【非特許文献7】Greenberg P. D. 他1名, J. Immunol. Methods, 1990年, Vol. 128, No. 2, P189～201

【非特許文献8】Deane F. Momer著, 1988年発行, FIBRONECTIN, ACADEMIC PRESS INC., P1～8

【非特許文献9】Kimizuka F. 他8名, J. Biochem., 1991年, Vol. 110, No. 2, p284～291

【非特許文献10】Hanenberg H. 他5名, Human Gene Therapy, 1997年, Vol. 8, No. 18, p2193～2206

【特許文献1】国際公開第96/06929号パンフレット

【特許文献2】国際公開第97/32970号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

本発明の目的は、安全性が高く、医療への使用に適した、細胞傷害活性を高いレベルで保持した細胞傷害性リンパ球を取得する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0020】

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、培地中における血清および血漿の総含有濃度が0～5%未満である培地を用いて、フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養から選択される少なくとも1つを行う工程を含むことを特徴とする、細胞傷害性リンパ球の製造方法に関する。本発明の第1の発明で製造される細胞傷害性リンパ球としては、フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を含まない培地を用いて製造されたものと比較して、インターロイキン-2レセプターを高発現する細胞傷害性リンパ球が例示される。また、本発明の第1の発明で製造される細胞傷害性リンパ球としては、フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を含まない培地を用いて製造されたものと比較して、CD8陽性細胞を高比率で含有する細胞傷害性リンパ球が例示される。また、本発明の第1の発明で製造される細胞傷害性リンパ球としては、フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を含まない培地を用いた細胞傷害性リンパ球の製造方法と比較して、拡大培養率が高い細胞傷害性リンパ球が例示される。また、本発明の第1の発明で製造される細胞傷害性リンパ球としては、フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を含まない培地を用いて製造されたものと比較して、細胞傷害活性が増強されたもしくは高い細胞傷害活性が維持された細胞傷害性リンパ球が例示される。

【0021】

本発明の第1の発明において、フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の使用については、これらが固相に固定化されて使用されることが例示される。ここで固相としては細胞培養用器材または細胞培養用担体が例示される。細胞培養用器材としては、シャーレ、フラスコまたはバッグが例示され、細胞培養用担体としては、ビーズ、メンブレンまたはスライドガラスが例示される。

【0022】

本発明の第1の発明において、細胞傷害性リンパ球としては、リンフォカイン活性化キラー細胞が例示される。

【0023】

本発明の第1の発明において、フィプロネクチンのフラグメントとしては、配列表の配列番号1～7で表されるアミノ酸配列を少なくとも1つ含んでなるポリペプチドであるか、または前記ポリペプチドのアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、前記ポリペプチドと同等な機能を有するポリペプチドが例示される。フィプロネクチンのフラグメントとしては、細胞接着活性および/またはヘパリン結合活性を有するものが例示される。また、フィプロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号8～19で表されるアミノ酸配列のいずれかからなるポリペプチドより選択されるポリペプチドが例示される。

【0024】

本発明の第1の発明において、当該製造方法を細胞培養用器材中で行う場合の一態様として、

(a) 培養開始時の細胞数と細胞培養用器材における培養面積との比率が、1cell/cm²～5×10⁵cells/cm²である、および/または

(b) 培養開始時の培地中の細胞の濃度が、1cell/ml～5×10⁵cells/mlである、

のいずれかの条件を満たすことが例示される。

また、このような製造方法としては、細胞培養液を希釀する工程を包含しない方法が例示される。

【0025】

本発明の第1の発明において、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持及び拡大培養の少なく

ともいすれか1つを、フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下、培地を含む細胞培養用器材中で行なう場合、例えば、少なくとも1回の細胞培養液を希釈する工程、培地を交換する工程もしくは細胞培養用器材を交換する工程を包含し、かつ少なくとも1回の細胞培養液を希釈する工程直後、培地を交換する工程直後もしくは細胞培養用器材を交換する工程直後の培養条件が

(c) 培養液中の細胞の濃度が 2×10^5 cells/ml～ 1×10^8 cells/mlである、もしくは

(d) 細胞培養用器材における培養面積との比率が 1×10^5 cells/cm²～ 1×10^8 cells/cm²である

のいすれかの条件を満たすことが例示される。

【0026】

本発明の第1の発明の製造方法において、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持及び拡大培養の少なくともいすれか1つを、フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下、培地を含む細胞培養用器材中で行なう場合、特に限定はないが、例えば、少なくとも1回の細胞培養液を希釈する工程、培地を交換する工程もしくは細胞培養用器材を交換する工程を包含し、かつ少なくとも1回の細胞培養液を希釈する工程直後、培地を交換する工程直後もしくは細胞培養用器材を交換する工程直後における培地中の血清および血漿の総含有濃度が培養開始時よりも低減されていることが例示される。

【0027】

本発明の第1の発明において、細胞傷害性リンパ球に外来遺伝子を導入する工程をさらに含む方法が例示される。ここで外来遺伝子の導入としては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはシミアンウイルスを用いて導入することが例示される。

【0028】

本発明の第2の発明は、本発明の第1の発明の方法により得られる細胞傷害性リンパ球に関する。

【0029】

本発明の第3の発明は本発明の第1の発明の方法により得られる細胞傷害性リンパ球を有効成分として含有する医薬に関する。

【0030】

本発明の第4の発明は、フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を有効成分として含有し、かつ血清および血漿の総含有濃度が0～5%未満であることを特徴とする細胞傷害性リンパ球培養用培地に関する。

【発明の効果】

【0031】

本発明により、安全性が高く、患者への負担が軽減された細胞傷害性リンパ球の製造方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0032】

本発明は、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持又は拡大培養方法において、フィプロネクチン及び/又はフィプロネクチンフラグメントの存在下に細胞傷害性リンパ球を調製することにより、培地中の血清や血漿の含有量を低減または除去しても、高い拡大培養率で充分な細胞傷害活性を有し、IL-2Rの発現量が高く、さらにCD8陽性細胞の比率が高い細胞傷害性リンパ球が得られることを見出し、完成するに至ったものである。

【0033】

なお、本明細書において細胞傷害性リンパ球の製造とは、当該細胞の誘導（活性化）、維持、拡大培養の各工程、もしくはこれらを組み合わせた工程を包含する工程を指す。また、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造を、細胞傷害性リンパ球の培養とも称する。

【0034】

以下、本発明を具体的に説明する。

(1) 本発明に使用されるフィプロネクチン、およびそのフラグメント

本明細書中に記載のフィプロネクチンおよびそのフラグメントは、天然から得られたもの、または人為的に合成されたもののいずれでもよい。フィプロネクチンおよびそのフラグメントは、例えば、ルオスラーティ E. ら [Ruosahti E., et al. 1.、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、第 256 卷、第 14 号、第 7277~7281 頁 (1981)] の開示に基づき、天然起源の物質から実質的に純粋な形態で製造することができる。ここで、本明細書に記載された実質的に純粋なフィプロネクチンまたはフィプロネクチンフラグメントとは、これらが天然においてフィプロネクチンと一緒に存在する他のタンパク質を本質的に含有していないことを意味する。上記のフィプロネクチンおよびそのフラグメントは、それぞれ単独で、もしくは複数の種類のものを混合して本発明に使用することができる。

【0035】

本発明に使用できるフィプロネクチンフラグメント、ならびに該フラグメントの調製に関する有用な情報は、キミヅカ F. ら [Kimiiduka F., et al. 1.、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.)、第 110 卷、第 284~291 頁 (1991)]、コーンブリット A. R. ら [Kornbriitt A. R., et al. 1.、EMBO ジャーナル (EMBO J.)、第 4 卷、第 7 号、1755~1759 (1985)]、およびセキグチ K. ら [Sekiguchi K., et al. 1.、バイオケミストリー (Biochemistry)、第 25 卷、第 17 号、4936~4941 (1986)] 等より得ることができる。

【0036】

本発明においては、フィプロネクチンフラグメントとしては、例えば、少なくとも I I I - 8 (配列表の配列番号 1 で表されるアミノ酸配列)、I I I - 9 (配列表の配列番号 2 で表されるアミノ酸配列)、I I I - 10 (配列表の配列番号 3 で表されるアミノ酸配列)、I I I - 12 (配列表の配列番号 4 で表されるアミノ酸配列)、I I I - 13 (配列表の配列番号 5 で表されるアミノ酸配列)、I I I - 14 (配列表の配列番号 6 で表されるアミノ酸配列)、および C S - 1 (配列表の配列番号 7 で表されるアミノ酸配列) のいずれかの領域を構成するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド (図 1 参照) が例示される。

【0037】

また、当該フラグメントとしては、細胞接着活性および/またはヘパリン結合活性を有するものが好適に使用できる。細胞接着活性は、本発明で使用されるフラグメント (その細胞結合ドメイン) と細胞との結合を公知の方法を使用してアッセイすることにより調べることができる。例えば、このような方法には、ウイリアムズ D. A. らの方法 [Williams D. A., et al. 1.、ネイチャー (Nature)、第 352 卷、第 438~441 頁 (1991)] が含まれる。当該方法は、培養プレートに固定化したフラグメントに対する細胞の結合を測定する方法である。また、ヘパリン結合活性は、本発明に使用されるフラグメント (そのヘパリン結合ドメイン) とヘパリンとの結合を公知の方法を使用してアッセイすることにより調べることができる。例えば、上記のウイリアムズ D. A. らの方法において、細胞に換えてヘパリン、例えば標識ヘパリンを使用することにより、同様の方法でフラグメントとヘパリンとの結合の評価を行うことができる。

【0038】

さらにフィプロネクチンのフラグメントとしては、C - 274 (配列表の配列番号 8 で表されるアミノ酸配列)、H - 271 (配列表の配列番号 9 で表されるアミノ酸配列)、H - 296 (配列表の配列番号 10 で表されるアミノ酸配列)、C H - 271 (配列表の配列番号 11 で表されるアミノ酸配列)、C H - 296 (配列表の配列番号 12 で表されるアミノ酸配列)、または C - C S 1 (配列表の配列番号 13 で表されるアミノ酸配列) より選択されるポリペプチドが例示される。

【0039】

上記のCH-271、CH-296、C-274、C-CS1の各フラグメントはVLA-5に結合する活性を有する細胞結合ドメインを有するポリペプチドである。また、C-CS1、H-296、CH-296はVLA-4に結合する活性を有する細胞結合ドメインを有するポリペプチドである。さらに、H-271、H-296、CH-271およびCH-296はヘパリン結合ドメインを有するポリペプチドである。

【0040】

本発明においては、上記の各ドメインが改変されたフラグメントも使用することができる。フィプロネクチンのヘパリン結合ドメインは3つのIII型配列(III-12、III-13、III-14)によって構成されている。前記III型配列のうちの一つもしくは二つを欠失したヘパリン結合ドメインを含むフラグメントも本発明に使用することが可能である。例えば、フィプロネクチンの細胞結合部位(VLA-5結合領域、Pro1239~Ser1515)と一つのIII型配列とが結合したフラグメントであるCHV-89(配列表の配列番号14で表されるアミノ酸配列)、CHV-90(配列表の配列番号15で表されるアミノ酸配列)、CHV-92(配列表の配列番号16で表されるアミノ酸配列)、あるいは二つのIII型配列とが結合したフラグメントであるCHV-179(配列表の配列番号17で表されるアミノ酸配列)、CHV-181(配列表の配列番号18で表されるアミノ酸配列)が例示される。CHV-89、CHV-90、CHV-92はそれぞれIII-13、III-14、III-12を含むものであり、CHV-179はIII-13とIII-14を、CHV-181はIII-12とIII-13をそれぞれ含んでいる。

【0041】

また、上記の各フラグメントにさらにアミノ酸を付加したフラグメントも本発明に使用することができる。当該フラグメントは、例えば、後述の製造例に記載のH-275-Cysの製造方法に準じて上記各フラグメントに所望のアミノ酸を付加することにより製造可能である。例えば、H-275-Cys(配列表の配列番号19で表されるアミノ酸配列)は、フィプロネクチンのヘパリン結合ドメインを有し、かつC末端にシステイン残基を有するフラグメントである。

【0042】

なお、本発明に使用されるフラグメントとしては、本発明の所望の効果が得られる限り、上記に例示した天然のフィプロネクチンのアミノ酸配列の少なくとも一部を含むフラグメントと同等な機能を有する、当該フラグメントを構成するポリペプチドのアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入若しくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドからなるものであってもよい。

【0043】

アミノ酸の置換等は、本来のポリペプチドの機能が維持され得る範囲内で該ポリペプチドの物理化学的性状等を変化させ得る程度のものであるのが好ましい。例えば、アミノ酸の置換等は、本来のポリペプチドの持つ性質(例えば、疎水性、親水性、電荷、pK等)を実質的に変化させない範囲の保存的なものである。例えば、アミノ酸の置換は、1. グリシン、アラニン；2. バリン、イソロイシン、ロイシン；3. アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；4. セリン、スレオニン；5. リジン、アルギニン；6. フェニルアラニン、チロシンの各グループ内での置換であり、アミノ酸の欠失、付加、挿入は、ポリペプチドにおけるそれらの対象部位周辺の性質に類似した性質を有するアミノ酸の、対象部位周辺の性質を実質的に変化させない範囲での欠失、付加、挿入である。

【0044】

また、「同等な機能を有する」とは、フィプロネクチンフラグメントを有する、(i)細胞傷害性リンパ球の細胞傷害活性の増強又は維持機能、(ii)IL-2Rの発現量の増強機能、または(iii)CD8陽性細胞の比率向上機能、(iv)細胞傷害性リンパ球の拡大培養率の向上の少なくともいずれかの機能を有することをいう。アミノ酸の置換等を有するポリペプチドからなるフラグメントが、それらの機能を有するかについては後

述の実施例に記載の方法に準じて適宜確認することができる。また、アミノ酸の置換等を有するポリペプチドからなるフラグメントとしては、細胞接着活性および／またはヘパリン結合活性を有するものが好適である。細胞接着活性およびヘパリン結合活性は、それらの前記活性測定方法に準じて評価することができる。

【0045】

アミノ酸の置換等を有するポリペプチドからなるフラグメントとして、例えば、2つの異なるドメイン間にリンカーとして1以上のアミノ酸が挿入されたフラグメントも本発明に使用することができる。

【0046】

なお、フィプロネクチン自体についても、上記のフラグメントと同様、そのポリペプチドのアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、少なくとも前記(i)～(iii)のいずれかの機能を有するポリペプチドを、本発明において使用することができる。

【0047】

本明細書中に記載のフィプロネクチンフラグメントは、例えば、米国特許第5,198,423号明細書の記載に基づいて遺伝子組換え体により製造することもできる。例えば、上記のH-271(配列番号9)、H-296(配列番号10)、CH-271(配列番号11)、CH-296(配列番号12)の各フラグメントならびにこれらを取得する方法は当該特許明細書に詳細に記載されている。また、上記のC-274(配列番号8)フラグメントは米国特許第5,102,988号明細書に記載された方法により得ることができる。さらに、C-CS1(配列番号13)フラグメントは日本特許第3104178号明細書に記載された方法により得ることができる。上記CHV-89(配列番号14)、CHV-90(配列番号15)、CHV-179(配列番号17)の各フラグメントは、日本特許第2729712号明細書に記載された方法により得ることができる。また、CHV-181(配列番号18)フラグメントは国際公開第97/18318号パンフレットに記載された方法に準じて得ることができる。CHV-92(配列番号16)フラグメントは、日本特許第2729712号明細書および国際公開第97/18318号パンフレットを参照し、それらの文献に記載されたプラスミドに基づいて定型的にプラスミドを構築し、該プラスミドを用いて遺伝子工学的に取得することができる。

【0048】

これらのフラグメントまたはこれらフラグメントから定型的に誘導できるフラグメントは、〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6 独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに下記受託番号のもとで寄託された微生物を用いて製造する、あるいは各微生物の保持するプラスミドを公知の方法により改変することにより製造することができる；

FERM BP-2264 (H-271をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、
 FERM BP-2800 (CH-296をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、
 FERM BP-2799 (CH-271をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、
 FERM BP-7420 (H-296をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、
 FERM BP-1915 (C-274をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、
 FERM BP-5723 (C-CS1をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、
 FERM P-12182 (CHV-89をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、
 FERM P-12183 (CHV-179をコードするプラスミドを保有する大腸菌)

。

【0049】

フィプロネクチンは巨大な糖タンパク質であるため、天然起源のタンパク質を調製して使用することは産業上および医薬品製造上、必ずしも容易ではない。また、フィプロネクチンは多機能タンパク質であることから、その使用の状況によっては、本発明の方法に効果を示す領域とは異なる領域に起因する不都合が起こることも考えられる。これらのことから、本発明においては、入手、取り扱いの容易さ、安全面の観点から、好適にはフィブ

ロネクチンフラグメント、さらに好適には前記のようにして得られる組換えフィプロネクチンフラグメントを使用することができる。さらに、後述するリンパ球の拡大培養率の向上、拡大培養されたリンパ球におけるIL-2Rの発現量の上昇、および拡大培養されたリンパ球集団中のCD8陽性細胞の比率の向上、細胞傷害活性の上昇等の効果を示すことができるフィプロネクチンフラグメントが特に好適に使用できる。また、本発明に使用されるフィプロネクチンフラグメントの分子量としては、特に限定はないが、好適には1～200kD、より好適には5～190kD、さらに好適には10～180kDである。

【0050】

(2) 本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法

以下、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法について具体的に説明する。本発明の方法は、前記した培地中における血清及び血漿の濃度が0～5%未満である培地を用いて、フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なう細胞傷害性リンパ球の製造方法である。

【0051】

本明細書において細胞傷害性リンパ球とは細胞傷害性リンパ球を含有する細胞群を意味する。なお、狭義には前記細胞群に含有されている細胞傷害性リンパ球のみを示すことがある。また、本発明において細胞傷害性リンパ球の製造とは、本発明の細胞傷害性リンパ球になり得る前駆細胞からの細胞傷害活性を有するリンパ球への誘導、細胞傷害性リンパ球の維持、細胞傷害性リンパ球および/または前駆細胞を用いた細胞傷害性リンパ球の拡大培養のいずれをも包含するものである。

【0052】

本発明の細胞傷害性リンパ球としては、特に限定するものではないが、例えば細胞傷害活性を有する、リンフォカイン活性化キラー細胞(LAK細胞)、細胞傷害性T細胞(CTL)、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、NK細胞等が挙げられる。

【0053】

本発明において、細胞傷害性リンパ球になり得る、すなわち、該リンパ球への分化能を有する前駆細胞としては、PBMC、NK細胞、ナイーブ細胞、メモリー細胞、造血幹細胞、臍帯血単核球等が例示される。また、血球系細胞であれば本発明において前駆細胞として使用できる。これらの細胞は生体から採取されたものをそのままもしくは凍結保存したもののがいずれも使用することができる。なお、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法では、前記細胞を含有する材料、例えば、末梢血液、臍帯血等の血液や、血液から赤血球や血漿等の成分を除去したもの、骨髄液等を使用することができる。

【0054】

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法は、フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物から選択される有効成分の存在下に細胞傷害性リンパ球を製造することを1つの大きな特徴とする。

【0055】

さらに、従来の細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法では、培地中に5～20%の血清・血漿の添加が必要であったのに対し、本発明の細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法は、これら血清および血漿の培地中の総含有濃度を0～5%未満とすることを特徴とする。血清および血漿の培地中の総含有濃度は、好適には0～4%、特に好適には0～3%とすることができる。本発明の特に好適な態様においては、培地中に血清・血漿を全く添加することなく、十分な細胞傷害性リンパ球の拡大培養を行うことができ、安全面や患者への負担を軽減させる点で非常に有用な方法である。また、本発明において、使用する血清・血漿の使用量をさらに低減させたい場合は、培養途中において血清・血漿の使用量を段階的に低減させることができる。すなわち、培養開始時の血清・血漿濃度に対して、後述する細胞培養液の希釀、培地交換もしくは細胞培養用器材の交換のタイミングで使用される新たな培地中の血清・血漿濃度を低減させるもしくは添加しないことで、血清・血漿の使用量を通常より低減させることができる。なお、血清又は血漿の由来としては、自己(使用す

る細胞傷害性リンパ球の前駆細胞と由来が同じであることを意味する) もしくは非自己(使用する細胞傷害性リンパ球の前駆細胞と由来が異なることを意味する) のいずれでも良いが、好適には安全性の観点から自己由来のものが使用できる。

【0056】

本発明の方法において、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および/または拡大培養は、通常、本発明の前記有効成分の存在下に、所定の成分を含む培地中で行なわれる。

【0057】

例えば、本発明の方法において、細胞傷害性リンパ球の誘導もしくは拡大培養を意図する場合、本発明において使用される培養開始時の細胞(細胞傷害性リンパ球および/または前駆細胞)数としては、特に限定はないが、例えば $1\text{ cell}/\text{ml} \sim 1 \times 10^8 \text{ cells}/\text{ml}$ 、好適には $1\text{ cell}/\text{ml} \sim 5 \times 10^7 \text{ cells}/\text{ml}$ 、さらに好適には $1\text{ cell}/\text{ml} \sim 2 \times 10^7 \text{ cells}/\text{ml}$ が例示される。また、培養条件に特に限定ではなく、通常の細胞培養に使用される条件を使用することができる。例えば、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 等の条件で培養することができる。また、適当な時間間隔で細胞培養液を新鮮な培地に希釀するか、培地を交換するか、もしくは細胞培養用器材を交換することができる。

【0058】

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法において使用される培地には血清、血漿の含有量を除いては特に限定はなく、細胞傷害性リンパ球、その前駆細胞の維持、生育に必要な成分を混合して作製された公知の培地を使用することができ、たとえば市販の培地を適宜選択して使用することができる。これらの培地はその本来の構成成分以外に適当なタンパク質、サイトカイン類、その他の成分を含んでいてもよい。好適には、IL-2を含有する培地が本発明に使用される。IL-2の培地中の濃度としては、特に限定はないが、例えば、好適には $0.01 \sim 1 \times 10^5 \text{ U}/\text{ml}$ 、より好適には $0.1 \sim 1 \times 10^4 \text{ U}/\text{ml}$ である。

【0059】

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法において使用される細胞培養用器材としては、特に限定はないが、例えば、シャーレ、フラスコ、バッグ、大型培養槽、バイオリアクター等を使用することができる。なお、バッグとしては、下記実施例34～38および45～52に記載のとおり、細胞培養用 CO_2 ガス透過性バッグを使用することができる。また、工業的に大量のリンパ球を製造する場合には、大型培養槽を使用することができる。また、培養は開放系、閉鎖系のいずれのものも使用することができるが、好適には得られるリンパ球の安全性の観点から閉鎖系で培養を行うことが好ましい。

【0060】

また、抗CD3抗体をさらに含有する培地中で細胞傷害性リンパ球になり得る前駆細胞を培養することもできる。抗CD3抗体の培地中の濃度としては、特に限定はないが、例えば $0.01 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ が好適である。抗CD3抗体はリンパ球上のレセプターを活性化する目的で添加することができる。また、この他、レクチン等のリンパ球刺激因子を添加することもできる。当該成分の培地中の濃度は、所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。

【0061】

なお、これらの成分は培地中に溶解して共存させる他、適切な固相、例えばシャーレ、フラスコ、バッグ等の細胞培養用器材(開放系のもの、および閉鎖系のもののいずれをも含む)、またはビーズ、メンブレン、スライドガラス等の細胞培養用担体に固定化して使用してもよい。それらの固相の材質は細胞培養に使用可能なものであれば特に限定されるものではない。該成分を、例えば、前記器材に固定化する場合、培地を該器材に入れた際に、該成分を培地中に溶解して用いる場合の所望の濃度と同様の割合となるように、器材に入れる培地量に対して各成分の一定量を固定化するのが好適であるが、当該成分の固定化量は所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。前記担体は、細胞培養時に細胞培養用器材中の培養液に浸漬して使用される。前記成分を前記担体に固定化する場合

、該担体を培地に入れた際に、該成分を培地中に溶解して用いる場合の所望の濃度と同様の割合となるように、器材に入れる培地量に対して各成分の一定量を固定化するのが好適であるが、当該成分の固定化量は所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。

【0062】

いずれの場合も前記成分の固定化は、公知の方法、例えば、後述するフィプロネクチンフラグメントの固定化方法に準じて行なうことができる。

【0063】

さらに、国際公開第02/14481号パンフレットに記載された、抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞の誘導に有効な酸性多糖、酸性オリゴ糖、酸性单糖およびそれらの塩からなる群より選択される化合物や、下記（A）～（D）から選択される物質を前記成分と共に用いてもよい。

（A）CD44に結合活性を有する物質

（B）CD44リガンドがCD44に結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質

（C）成長因子の成長因子レセプターへの結合を阻害し得る物質

（D）成長因子が成長因子レセプターに結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質

【0064】

前記CD44に結合活性を有する物質としては、例えばCD44リガンドおよび/または抗CD44抗体が例示される。CD44リガンドがCD44に結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質としては、例えば各種リン酸化酵素および脱リン酸化酵素の阻害剤又は活性化剤が挙げられる。成長因子の成長因子レセプターへの結合を阻害し得る物質としては、例えば成長因子に結合活性を有し、成長因子と複合体を形成することにより成長因子が成長因子レセプターに結合するのを阻害する物質、もしくは成長因子レセプターに結合活性を有し、成長因子が成長因子レセプターに結合するのを阻害する物質が挙げられる。さらに、成長因子が成長因子レセプターに結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質としては、例えば各種リン酸化酵素および脱リン酸化酵素の阻害剤又は活性化剤が挙げられる。これらの成分の培地中の濃度は、所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。また、これらの成分は培地中に溶解して共存させる他、前記のような適切な固相に固定化して使用してもよい。

なお、上記の各種物質は単独で、もしくは2種以上混合して用いることができる。

【0065】

本発明において前記有効成分の存在下とは、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持または拡大培養を行なう際に、前記有効成分がその機能を發揮し得る状態で存在することをいい、その存在状態は特に限定されるものではない。例えば、有効成分を使用する培地に溶解させる場合、培養を行う培地中における、本発明の有効成分の含有量は所望の効果が得られれば特に限定するものではないが、例えば、好ましくは0.001～10000μg/m¹、より好ましくは0.01～1000μg/m¹、さらに好ましくは0.1～100μg/m¹である。なお、有効成分は、このように培地中に溶解して共存させる他、適切な固相、例えばシャーレ、フラスコ、バッグ等の細胞培養用器材（開放系のもの、および閉鎖系のもののいずれをも含む）、またはビーズ、メンブレン、スライドガラス等の細胞培養用担体に固定化して使用してもよい。培養された細胞傷害性リンパ球を生体に投与する観点からは、特に限定はないが、前記有効成分を固定化して使用することが望ましい。

【0066】

前記の種々の成分や、本発明の有効成分を固相に固定化しておけば、本発明の方法により細胞傷害性リンパ球を得た後、該リンパ球と固相とを分離するのみで、有効成分等と該リンパ球とを容易に分離することができ、該リンパ球への有効成分等の混入を防ぐことができる。

【0067】

本発明の有効成分を、例えば、前記器材に固定化する場合、培地を該器材に入れた際に

、該成分を培地中に溶解して用いる場合の所望の濃度と同様の割合となるように、器材に入れる培地量に対して各成分の一定量を固定化するのが好適であるが、所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。有効成分を前記担体に固定化する場合、該担体を培地に入れた際に、該成分を培地中に溶解して用いる場合の所望の濃度と同様の割合となるように、器材に入れる培地量に対して各成分の一定量を固定化するのが好適であるが、所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。

【0068】

例えば、フィブロネクチンのフラグメントの固定化は、国際公開第97/18318号パンフレット、ならびに国際公開第00/09168号パンフレットに記載の方法により実施することができる。

【0069】

本発明の製造方法によって得られた細胞傷害性リンパ球についてIL-2Rの発現量を測定すると、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なった細胞傷害性リンパ球に比較して有意なIL-2R発現量の増加が認められる。ここで、IL-2R発現量は公知の方法、例えば、抗IL-2R抗体を使用して測定することができる。

【0070】

上記のように、本発明の方法により得られた細胞傷害性リンパ球はIL-2Rの発現量が増加している。IL-2Rは活性化T細胞表面に発現する活性化マーカーであり、この分子の発現に伴い、サイトカイン産生、細胞傷害活性、増殖活性等が活性化される。よって、本発明の方法により得られる細胞傷害性リンパ球は高い機能を有する細胞群である。

【0071】

また、本発明の方法により得られる細胞傷害性リンパ球は、IL-2Rの発現量が増加していることから、培地中に添加されたIL-2、あるいは細胞傷害性リンパ球の前駆細胞、リンパ球自体もしくは共存する他の細胞が産生したIL-2による刺激に対する感受性が向上している。このため、IL-2の少ない環境下（例えば体内等）でも自ら活性化することができる。

【0072】

さらに、本発明の方法により得られた細胞傷害性リンパ球では、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なったものに比べてCD8マーカーを有する（CD8陽性）細胞の存在する比率が高い。このことは、例えば、1. CD8陽性細胞はインターフェロン-γ等のサイトカインを産生して、免疫賦活を引き起こし、ヘルパーT細胞バランスをTh1系にする、2. CD8陽性細胞は細胞性免疫担当細胞であり、ウイルスや腫瘍細胞等の異物を効率よく排除することができる、3. CD8陽性細胞を得る場合は、従来はマグネットビーズやフローサイトメーターでCD8陽性細胞を精製していたが、本発明の方法では培養しながらCD8陽性細胞をエンリッチにすることができる、4. CD8陽性細胞比が多いことから、CTLを誘導する際の前駆細胞としての使用に適している、5. CD8陽性細胞比の少ない細胞集団からでも、CD8陽性細胞比率を高めながら培養することができる、等の利点がある。よって、本発明の方法は細胞傷害性リンパ球の調製において極めて有用である。

【0073】

なお、本発明の方法により得られた細胞傷害性リンパ球におけるCD8陽性細胞の比率は、特に限定するものではないが、例えば抗CD8抗体を使用して測定することができる。

【0074】

また、本発明の方法により調製された細胞傷害性リンパ球は培養後の細胞を長期間にわたり維持、あるいはこれを増殖させても、従来観察されたような高い細胞傷害活性が維持されているという性質を有している。すなわち、該細胞傷害性リンパ球は、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に誘導、維持および拡大培養

の少なくともいずれか1つを行なったものと比べて、細胞傷害活性が高く維持される。従って、培養された細胞傷害性リンパ球をクローン化することにより、安定した細胞傷害活性を有するリンパ球として維持することもできる。また、誘導された細胞傷害性リンパ球に抗原、各種サイトカイン、抗CD3抗体刺激を与えることにより増殖させ、拡大培養することができる。この細胞傷害性リンパ球の維持、拡大培養には、特に限定はなく、公知の方法を用いることができる。

【0075】

上記の細胞傷害性リンパ球の維持とは、細胞傷害性リンパ球を細胞傷害活性を保ったままで維持することをいう。その際の培養条件に特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を適用することができる。例えば、37℃、5%CO₂等の条件で培養することができる。また、適当な時間間隔で培地を新鮮なものに交換することができる。使用される培地や、同時に使用されるその他の成分等は前記と同様である。

【0076】

本発明の方法における細胞傷害性リンパ球の維持および拡大培養は、本発明の有効成分、すなわちフィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下、培地中における血清及び血漿の濃度が0～5%未満である培地中で細胞傷害性リンパ球をそれぞれ継続培養および拡大培養することを1つの大きな特徴とする。拡大培養によれば、細胞傷害性リンパ球の有する細胞傷害活性を維持させた状態でその細胞数を増加させることができる。すなわち、本発明の方法は、1つの態様として、細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法を提供する。

【0077】

本発明の方法により得られる細胞傷害性リンパ球は所望の標的細胞を認識する能力を有しており、例えば標的となる細胞を、その細胞傷害活性により破壊する。この細胞傷害性リンパ球の細胞傷害活性は公知の方法により評価できる。例えば、放射性物質、蛍光物質等で標識した標的細胞に対する細胞傷害性リンパ球の細胞傷害活性を、細胞傷害性リンパ球により破壊された標的細胞に由来する放射活性や蛍光強度を測定することによって評価できる。また、細胞傷害性リンパ球や標的細胞より特異的に遊離されるGM-CSF、IFN-γ等のサイトカイン量を測定することにより検出することもできる。その他蛍光色素等によって標識された抗原ペプチド-MHC複合体の使用によって直接確認することもできる。この場合、例えば細胞傷害性リンパ球を細胞傷害性リンパ球特異性抗体とカップリングさせた第1蛍光マーカーと接触させた後に第2蛍光マーカーとカップリングさせた抗原ペプチド-MHC複合体を接触させ、そして二重標識細胞の存在をFACS (fluorescence-activated cell sorting) 分析することにより細胞傷害性リンパ球の細胞傷害活性を評価することができる。

【0078】

さらに、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法の特徴として、低細胞数から培養を開始することが可能である。養子免疫療法を行うためには大量のリンパ球が必要となるが、患者から大量のリンパ球を取得することは困難である。また、通常の細胞傷害性リンパ球の拡大培養では、使用する細胞数に応じた適切な培養面積の細胞培養用器材の選択や、適切な培地量での培養が必要となる。すなわち、通常は細胞培養用器材における培養面積〔すなわち、培地に接触している器材表面部分の面積 (cm²)〕に対する細胞量(個数)は1×10⁶ cells/cm²以上、細胞濃度は1×10⁶ cells/ml以上の高密度で培養が開始され、これ以下の細胞量条件では、拡大培養率〔拡大培養前の細胞数に対する拡大培養後の細胞数の比(拡大培養後の細胞数/拡大培養前の細胞数)〕が非常に低くなり、大量の細胞傷害性リンパ球を得るまでに長期の培養期間を要する。よって、一般的には、例えば、小さな細胞培養用器材を用いて培養を開始した後、段階的に大きなスケールの細胞培養用器材を使用する、もしくは細胞培養用器材の数を増やして希釈操作を繰り返す等の方法により、大量のリンパ球を製造するのが現状である。このように、通常の細胞傷害性リンパ球の拡大培養では、複数の培養系を必要とする。

【0079】

本発明の方法により、少量の細胞量より開始された場合でも細胞培養用器材の大きさに関わらず、高い拡大培養率で培養を行うことができる。よって、従来のような面倒な細胞培養用器材や細胞培養液の交換、細胞培養液の希釈操作は不要となる。すなわち、本発明の方法によれば、1つの細胞培養用器材を用いた培養操作により、換言すれば、1つの培養系により、充分な細胞傷害性リンパ球の拡大培養を行なうことができる。よって、本発明の方法は、細胞培養液を希釈する工程を包含しない細胞傷害性リンパ球の製造方法である。特に、本発明の方法でLAK細胞を拡大培養する場合、大容量の細胞培養用器材にLAK細胞となり得る細胞と培地を添加し、それ以降はIL-2を添加するのみでLAK細胞の拡大培養を行うことが可能である。簡便な操作で大量のLAK細胞を得ることができることにおいて、本発明は非常に有用である。この際、使用する本発明の有効成分としては、より高い拡大培養率を得るという観点から、好適にはフィブロネクチンフラグメントが使用できる。このように、本発明の方法によれば、短時間に必要量の細胞傷害性リンパ球を得ることができる。

【0080】

例えば、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを、本発明の有効成分の存在下、培地を含む細胞培養用器材中で低細胞数から開始する場合、培養開始時において、下記(a)および(b)から選択される条件を満たす細胞量を使用して行なうことができる。

(a) 使用する細胞培養用器材における培養面積に対する細胞量の比率が、好適には $1\text{ cells/cm}^2 \sim 5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ 、より好適には $10 \text{ cells/cm}^2 \sim 1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ 、特に好適には $1 \times 10^2 \text{ cells/cm}^2 \sim 5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ である。

(b) 培地中の細胞の濃度が、好適には $1 \text{ cells/ml} \sim 5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 、より好適には $10 \text{ cells/ml} \sim 1 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 、特に好適には $1 \times 10^2 \text{ cells/ml} \sim 5 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ である。

なお、ここで細胞量とは、細胞傷害性リンパ球および/または前駆細胞の個数をいう。

【0081】

また、本発明の方法においては、細胞培養液の希釈操作の工程を包含しない、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを1つの培養系で行なう方法が例示される。

【0082】

さらに本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法の特徴として、高細胞数での培養を行うことが可能となる。すなわち、培養途中に細胞培養液を新鮮な培地で希釈する工程、培地を交換する工程、もしくは細胞培養用器材を交換する工程を包含する場合、これらの工程直後の培養条件を高濃度（例えば、培養液中の細胞の濃度が $2 \times 10^5 \text{ cells/ml} \sim 1 \times 10^8 \text{ cells/ml}$ 、好適には $2 \times 10^5 \text{ cells/ml} \sim 5 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ 、さらに好適には $2 \times 10^5 \text{ cells/ml} \sim 2 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ ）もしくは高密度（例えば、細胞培養用器材における培養面積との比率が $1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 1 \times 10^8 \text{ cells/cm}^2$ 、好適には $1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 5 \times 10^7 \text{ cells/cm}^2$ 、さらに好適には $1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 2 \times 10^7 \text{ cells/cm}^2$ ）に設定した場合においても、本発明の方法は従来法と比較して、良好な拡大培養率を実現することができる。通常の細胞傷害性リンパ球の拡大培養においては、培養開始時は細胞数を比較的高濃度もしくは高密度に設定されることが多いが、細胞の増殖率が上がってくると培養液の細胞濃度や培養基材中の細胞密度を低く設定される。本発明の高細胞数での培養とは、このような培養途中における細胞濃度や細胞密度の設定時において培養液中の細胞の濃度が、 $2 \times 10^5 \text{ cells/ml} \sim 1 \times 10^8 \text{ cells/ml}$ 、もしくは細胞培養用器材における培養面積との比率が $1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 1 \times 10^8 \text{ cells/cm}^2$ という高濃度又は高密度な条件に設定される細胞傷害性リンパ球の製造方法である。なお、ここでいう細胞培養液を新鮮な培地で希釈する工程直後、培地を交換する工程直後、もしくは細胞培養用器材を交換する工程

直後とは、培養開始時を包含するものではない。

【0083】

このような高細胞数での培養が実施できる利点としては、使用する培地、血清・血漿等の培地添加物、細胞培養用器材、労力および培養スペースの削減が挙げられる。養子免疫療法では大量のリンパ球を必要とするため、使用される培地や細胞培養用器材が非常に多く必要となり、それに伴って大規模な培養スペースや多くの人員も必要となる。これらは養子免疫療法が普及する上で大きな課題となるものである。従って、本発明の方法はこのような課題を解決することができることから施設の設営、運営上、非常に有意義な発明である。

【0084】

前述したとおり、本発明の方法は、低濃度もしくは低密度での細胞培養、高濃度もしくは高密度での細胞培養のいずれにも適用可能な方法であることから、本発明の方法を用いることにより、培養状況に応じてさまざまな細胞濃度もしくは細胞密度での細胞傷害性リンパ球の製造が可能となる。

【0085】

また、本発明の方法においては、適切なフィーダ細胞と共に培養することもできる。細胞傷害性リンパ球をフィーダ細胞と共に培養する場合には、細胞傷害性リンパ球、フィーダ細胞の両者の維持、生育に適した培地であることが望ましい。当該培地としては、市販の培地が使用できる。

【0086】

本発明の方法に使用されるフィーダ細胞は、抗CD3抗体と協同して細胞傷害性リンパ球を刺激し、T細胞レセプターを活性化するものであれば特に限定はない。本発明には、例えば、PBMCやエプスタイン-バールウイルスによって形質転換されたB細胞（EBV-B細胞）が使用される。通常、フィーダ細胞は放射線照射のような手段で増殖能を奪ったうえで使用される。なお、フィーダ細胞の培地中における含有量は公知の方法に従つて決定すればよく、例えば、 $1 \times 10^5 \sim 7$ cells/m²が好適である。

【0087】

特に好ましい態様においては、フィーダ細胞として、非ウイルス感染細胞、例えば、EBV-B細胞以外のものが使用される。これにより、拡大培養された細胞傷害性リンパ球中にEBV-B細胞が混在する可能性を排除することができ、養子免疫療法のような細胞傷害性リンパ球を利用した医療の安全性を高めることが可能となる。

【0088】

また、本発明の方法においては、適切な抗原提示細胞と共に培養することもできる。抗原提示細胞は、抗原提示能を有する細胞に抗原ペプチドを付加し、その表面に抗原ペプチドを提示させることにより調製することができる〔例えば、ベンドナレク M. A. ら (Bendnak M. A., et al.)、J. Immunol.、第147巻、第12号、第4047～4053頁 (1991) を参照〕。また、抗原提示能を有する細胞が抗原を処理 (process) する能力を有している場合には、当該細胞に抗原を負荷することにより、抗原が細胞内に取り込まれてプロセッシングを受け、断片化された抗原ペプチドが細胞表面に提示される。なお、抗原ペプチドを抗原提示能を有する細胞に付加する場合、使用される抗原提示細胞、誘導しようとする細胞傷害性リンパ球のMHC拘束性に合致する抗原ペプチドまたはMHC非拘束性の抗原ペプチドが使用される。

【0089】

なお、本発明において使用される抗原は特に限定されるものではなく、例えば、細菌、ウイルスなどの外来性抗原や腫瘍関連抗原（癌抗原）などの内因性抗原等が挙げられる。

【0090】

本発明においては、抗原提示細胞は非増殖性とすることが好ましい。細胞を非増殖性とするためには、例えばX線等の放射線照射またはマイトマイシン (mitomycin) 等の薬剤による処理を行えばよい。

【0091】

本発明の製造方法によりLAK細胞を製造する場合、前記有効成分の存在下、IL-2とともにLAK細胞となり得る細胞をインキュベートすることにより実施される。LAK細胞となり得る細胞としては、特に限定されるものではなく、例えば末梢血単核球（PBMC）、NK細胞、臍帯血単核球、造血幹細胞、これらの細胞を含有する血液成分等が挙げられる。

【0092】

また、LAK細胞を培養するための一般的な条件は、上記の培地を使用する点を除いては、公知の条件〔例えば、細胞工学、Vol. 14、No. 2、p223~227、(1995年)；細胞培養、17、(6)、p192~195、(1991年)；THE LANCET、Vol. 356、p802~807、(2000)；Current Protocols in Immunology, supplement 17, UNIT 7.7を参照〕に従えばよい。培養条件には特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を使用することができ、例えば、37℃、5%CO₂等の条件下で培養することができる。この培養は通常、2~15日程度実施される。また、適当な時間間隔で細胞培養液を希釈する工程、培地を交換する工程もしくは細胞培養用器材を交換する工程を行っても良い。

【0093】

上記のLAK細胞の誘導、維持、拡大培養と同様に、フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に培養することにより、CTL、TILについても高い細胞傷害活性を有する細胞群を調製することができる。本発明においては、これらの細胞の活性化操作においてフィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を共存させ、かつ培地中における血清及び血漿の濃度が0~5%未満である培地を使用する他には特に限定はなく、前記細胞の培養、活性化に適した培地を使用して実施することができる。フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の使用量、添加方法等については前記方法に準じて適切なものを選択すればよい。

【0094】

なお、本発明の細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法については、前記有効成分が、当該方法に使用される培養系に存在しており、さらに培地中の血清及び血漿の濃度が0~5%未満であれば特に限定は無く、上記以外の従来の細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法において、その培養系に前記有効成分を存在させて、さらに培地中の血清及び血漿の濃度が0~5%未満であれば本発明に包含される。

【0095】

本発明の別の態様として、フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を有効成分として含有し、かつ培地中における血清及び血漿の濃度が0~5%未満である細胞傷害性リンパ球培養用培地が提供される。当該培地は、さらにその他の任意の成分、たとえば、公知の細胞培養に用いられる培地成分、タンパク質、サイトカイン類（好適にはIL-2）、所望のその他の成分とからなる。なお、当該培地は、本発明の有効成分、および培地中の総含有濃度が0~5%未満となるように自己又は非自己の血清や血漿を用い、公知の方法に準じて製造することができる。当該培地中の本発明の有効成分等の含有量は、本発明の所望の効果が得られれば特に限定されるものではなく、例えば、本発明の方法に使用される前記培地中の有効成分等の含有量に準じて、所望により、適宜、決定することができる。本発明の培地の一態様としては、フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物が固定化された細胞培養用担体を含有する培地、フィプロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物が固定化された細胞培養用器材に封入して提供される培地が包含される。

【0096】

上記の細胞傷害性リンパ球の製造方法を用いて得られたリンパ球含有培養物中には、通常、ヘルパーT細胞等の細胞傷害性リンパ球以外の細胞も混在している。しかしながら、本発明により得られたリンパ球含有培養物中には細胞傷害活性を保持するリンパ球が多く含まれているため、該培養物から遠心分離等により該培養物中の細胞を回収し、本発明の

方法により得られた細胞傷害性リンパ球としてそのまま使用することができる。しかも、前記有効成分等を細胞培養用器材等に固定化しておけば、得られた細胞傷害性リンパ球における該成分等の混入の心配はない。

【0097】

また、さらに該培養物から公知の方法により、細胞傷害性リンパ球を高含有する細胞集団（あるいは培養物）を分離し、本発明の方法により得られた細胞傷害性リンパ球として使用することもできる。すなわち、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法は、当該方法により得られた培養物から細胞傷害性リンパ球を高含有する細胞集団を選択する工程を含むことができる。

【0098】

細胞傷害性リンパ球を高含有する該細胞集団の選択方法については特に限定はないが、例えば培養物から所望の細胞表面上に発現している細胞表面抗原に対する抗体、例えば抗CD8抗体を結合させた細胞培養用器材もしくは担体を用いて目的の細胞のみを選択的に回収する方法や、フローサイトメーターを用いる方法が挙げられる。前記担体としては磁気ビーズやカラムが例示される。また、培養物から所望の細胞以外の細胞を吸着除去することにより、目的の細胞を高含有する細胞集団を得ることもできる。例えば、ヘルパーT細胞表面上に発現している細胞表面抗原に対する抗体、例えば抗CD4抗体を使用し、当該リンパ球培養物からヘルパーT細胞を除去することができる。この工程にはフローサイトメーターを用いることもできる。

【0099】

さらに本発明は、上記の本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法で得られた、細胞傷害性リンパ球を提供する。当該リンパ球、高い細胞傷害活性を有しており、長期間にわたる継続培養や拡大培養を行っても細胞傷害活性の低下が少ないという性質を有する。また、本発明は、当該リンパ球を有効成分として含有する医薬（治療剤）を提供する。特に、当該リンパ球を含有する前記治療剤は養子免疫療法への使用に適している。養子免疫療法においては、患者の治療に適した細胞傷害活性を有するリンパ球が、例えば静脈への投与によって患者に投与される。当該治療剤は製薬分野で公知の方法に従い、例えば、本発明の方法により調製された当該リンパ球を有効成分として、たとえば、公知の非経口投与に適した有機または無機の担体、賦形剤、安定剤等と混合することにより調製できる。なお、治療剤における本発明のリンパ球の含有量、治療剤の投与量、当該治療剤に関する諸条件は公知の養子免疫療法に従って適宜、決定できる。

【0100】

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法においては、当該リンパ球に外来遺伝子を導入する工程をさらに包含することができる。すなわち、本発明は、その一態様として、細胞傷害性リンパ球に外来遺伝子を導入する工程をさらに含む細胞傷害性リンパ球の製造方法を提供する。なお、「外来」とは、遺伝子導入対象のリンパ球に対して外来であることをいう。

【0101】

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法、特に細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法を行うことにより、培養されるリンパ球のDNA複製能が増強される。よって、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法に、遺伝子の導入工程を包含することにより、遺伝子の導入効率の上昇が期待される。

【0102】

外来遺伝子の導入手段には特に限定はなく、公知の遺伝子導入方法により適切なものを選択して使用することができる。遺伝子導入の工程は、細胞傷害性リンパ球の製造の際、任意の時点で実施することができる。例えば、前記リンパ球の誘導、維持および／または拡大培養のいずれかの工程と同時に、あるいは該工程の後に実施するのが、作業効率の観点から好適である。

【0103】

前記の遺伝子導入方法としては、ウイルスベクターを使用する方法、該ベクターを使用
出証特2004-3085985

しない方法のいずれもが本発明に使用できる。それらの方法の詳細についてはすでに多くの文献が公表されている。

【0104】

前記ウイルスベクターには特に限定はなく、通常、遺伝子導入方法に使用される公知のウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、シミアンウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターまたはセンダイウイルスベクター等が使用される。特に好適には、ウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはシミアンウイルスが使用される。上記ウイルスベクターとしては、感染した細胞中で自己複製できないように複製能を欠損させたものが好適である。

【0105】

レトロウイルスベクターは、当該ベクターが導入される細胞の染色体DNA中に該ベクターに挿入されている外来遺伝子を安定に組み込むことができ、遺伝子治療等の目的に使用されている。当該ベクターは分裂、増殖中の細胞に対する感染効率が高いことから、本発明における、細胞傷害性リンパ球の製造工程、例えば、拡大培養の工程において遺伝子導入を行なうのに好適である。

【0106】

ウイルスベクターを使用しない遺伝子導入方法としては、本発明を限定するものではないが、例えば、リポソーム、リガンド-ポリリジンなどの担体を使用する方法やリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法などを使用することができる。この場合にはプラスミドDNAや直鎖状DNAに組み込まれた外来遺伝子が導入される。

【0107】

本発明において細胞傷害性リンパ球に導入される外来遺伝子には特に限定はなく、前記細胞に導入することが望まれる任意の遺伝子を選ぶことができる。このような遺伝子としては、例えば、タンパク質（例えば、酵素、サイトカイン類、レセプター類等）をコードするものの他、アンチセンス核酸やリボザイムをコードするものが使用できる。また、遺伝子導入された細胞の選択を可能にする適当なマーカー遺伝子を同時に導入してもよい。

【0108】

前記の外来遺伝子は、例えば、適当なプロモーターの制御下に発現されるようにベクターやプラスミド等に挿入して使用することができる。また、効率のよい遺伝子の転写を達成するために、プロモーターや転写開始部位と協同する他の調節要素、例えば、エンハンサー配列やターミネーター配列がベクター内に存在していてもよい。また、外来遺伝子を相同組換えにより導入対象のリンパ球の染色体へ挿入することを目的として、例えば、該染色体における該遺伝子の所望の標的挿入部位の両側にある塩基配列に各々相同性を有する塩基配列からなるフランкиング配列の間に外来遺伝子を配置させてもよい。導入される外来遺伝子は天然のものでも、または人工的に作製されたものでもよく、あるいは起源を異にするDNA分子がライゲーション等の公知の手段によって結合されたものであってもよい。さらに、その目的に応じて天然の配列に変異が導入された配列を有するものであってもよい。

【0109】

本発明の方法によれば、例えば、がん等の患者の治療に使用される薬剤に対する耐性に関連する酵素をコードする遺伝子を細胞傷害性リンパ球に導入して該リンパ球に薬剤耐性を付与することができる。そのような細胞傷害性リンパ球を用いれば、養子免疫療法と薬剤療法とを組み合わせることができ、従って、より高い治療効果を得ることが可能となる。薬剤耐性遺伝子としては、例えば、多剤耐性遺伝子（multidrug resistance gene）が例示される。

【0110】

一方、前記の態様とは逆に、特定の薬剤に対する感受性を付与するような遺伝子を細胞傷害性リンパ球に導入して、該薬剤に対する感受性を付与することもできる。かかる場合

、生体に移植した後のリンパ球を当該薬剤の投与によって除去することが可能となる。薬剤に対する感受性を付与する遺伝子としては、例えば、チミジンキナーゼ遺伝子が例示される。

【実施例】

【0111】

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの記載に何ら限定されるものではない。

【0112】

製造例1 フィブロネクチンフラグメントの調製

(1) フィブロネクチンフラグメントの調製

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント H-271は、Escherichia coli HB101/pHD101 (FERM BP-2264) より、米国特許第5,198,423号明細書に記載の方法により調製した。

また、ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント H-296、CH-271、CH-296はそれぞれ、Escherichia coli HB101/pHD102 (FERM BP-7420)、Escherichia coli HB101/pCH101 (FERM BP-2799)、Escherichia coli HB101/pCH102 (FERM BP-2800) を用い、これを上記の明細書に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント C-274は、Escherichia coli JM109/pTF7221 (FERM BP-1915) を用い、これを米国特許第5,102,988号明細書に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント C-CS1は、Escherichia coli HB101/pCS25 (FERM BP-5723) を用い、日本特許3104178号明細書に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント CHV-89、CHV-179は、それぞれEscherichia coli HB101/pCHV89 (FERM P-12182)、Escherichia coli HB101/pCHV179 (FERM P-12183) を用い、日本特許2729712号明細書に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

また、ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント CHV-90は日本特許2729712号明細書に記載の方法で調製した。すなわち、当該明細書に記載の操作によってプラスミドpCHV90を構築したうえ、該プラスミドを保有する形質転換体を培養し、該培養物よりCHV-90を調製した。

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント CHV-181は、国際公開第97/18318号パンフレットに記載の方法で、CHV-181をコードするDNAを含有するプラスミド (pCHV181) を構築した後、該プラスミドを導入された大腸菌 (Escherichia coli HB101/pCHV181) を培養し、該培養物より、上記のCHV-179と同様の方法で調製した。

【0113】

(2) CHV-92の調製

上記のポリペプチドCHV-181を発現させるためのプラスミド pCHV181について、CHV-181をコードする領域中のIII-13領域をコードする領域を欠失したプラスミドCHV92を構築した。欠失操作は日本特許2729712号明細書に記載の、プラスミドpCHV179からのIII-14コード領域の欠失操作に準じて行った。

上記のプラスミドpCHV92で形質転換された大腸菌HB101 (Escherichia coli HB101/pCHV92) を培養し、該培養物より日本特許第2729712号明細書に記載のCHV-89ポリペプチドの精製方法に準じて精製操作を行い、精製CHV-92標品を得た。

【0114】

(3) H-275-Cysの調製

ポリペプチドH-275-Cysを発現させるためのプラスミドは以下に示す操作に従って構築した。Escherichia coli HB101/pCH102 (FERM BP-2800) よりプラスミドpCH102を調製した。このプラスミドを鋳型とし、配列表の配列番号20に塩基配列を示すプライマー12Sと配列表の配列番号21に塩基配列を示すプライマー14Aとを用いたPCRを行い、フィブロネクチンのヘパリン結合ドメインをコードする約0.8kbのDNA断片を得た。得られたDNA断片をNcoI、BamHI (ともにタカラバイオ社製) で消化した後、NcoI、BamHIで消化したpTV118N (タカラバイオ社製) とライゲーションすることにより、プラスミドpRH1を構築した。

【0115】

プラスミドベクターpINI111-ompA1 [Gh r a y e b J., et al.], EMBO J., 第3巻、第10号、第2437~2442頁(1984)] をBamHIとHincII (タカラバイオ社製) で消化し、リポプロテインターミネーター領域を含む約0.9kbのDNA断片を回収した。これをBamHIとHincIIで消化した上記のプラスミドpRH1と混合してライゲーションを行い、lacプロモーター、ヘパリン結合ドメインをコードするDNA断片およびリポプロテインターミネーターをこの順に含むプラスミドpRH1-Tを得た。

【0116】

このプラスミドpRH1-Tを鋳型とし、配列表の配列番号22に塩基配列を示すプライマー-Cys-Aと配列表の配列番号23に塩基配列を示すプライマー-Cys-Sとを用いたPCR反応の後、回収した増幅DNA断片をNotI (タカラバイオ社製) で消化し、さらに該DNA断片をセルフライゲーションさせた。こうして得られた環状DNAをSpeIとScaI (タカラバイオ社製) で消化して得られる2.3kbのDNA断片と、プラスミドpRH1-TをSpeIとScaI (タカラバイオ社製) で消化して得られる2.5kbのDNA断片とを混合してライゲーションを行い、プラスミドpRH-Cysを得た。該プラスミドには、前記のH-271のN末端側にMet-Ala-Ala-Serの4アミノ酸が付加され、さらにC末端にCysが付加されたポリペプチドH-275-Cysがコードされている。

【0117】

ポリペプチドH-275-Cysは以下の方法により調製した。上記のプラスミドpRH-Cysで形質転換された大腸菌HB101 (Escherichia coli HB101/pRH-Cys) を120mlのLB培地で1晩培養した。培養液より回収した菌体を40mlの破碎用緩衝液(50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 1mM DTT, 1mM PMSF, pH 7.5)に懸濁し、超音波処理を行って菌体を破碎した。遠心分離を行って得られた上清を精製用緩衝液(50mM Tris-HCl, pH 7.5)で平衡化されたハイトラップ-ヘパリンカラム (ファルマシア社製) にかけた。同緩衝液でカラム内の非吸着画分を洗浄した後、0~1M NaCl濃度勾配を持つ精製用緩衝液で溶出を行った。溶出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析し、H-275-Cysの分子量に相当する画分を集めて精製H-275-Cys標品を得た。

【0118】

実施例1 低血清培地を用いたLAK細胞 (Lymphokine-activated killer cells) 培養系における拡大培養率の測定

(1) PBMCの分離および保存

インフォームド・コンセントの得られたヒト健常人ドナーより成分採血を実施後、採血液をPBS (-) で2倍希釈し、Ficoll-paque (ファルマシア社製) 上に重層して500×gで20分間遠心分離した。中間層の末梢血単核細胞 (PBMC) をピペットで回収、洗浄した。採取したPBMCは90% FBS (Bio Whitake

r社製) / 10%DMSO (SIGMA社製) からなる保存液に懸濁し、液体窒素中にて保存した。LAK誘導時にはこれら保存PBMCを37℃水浴中にて急速融解し、10μg/ml DNase (Calbiochem社製) を含む RPMI1640培地 (Biowhittaker社製) で洗浄後、トリパンブルー染色法にて生細胞数を算出して各実験に供した。

【0119】

(2) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材(容器)に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。すなわち24穴細胞培養プレートまたは12.5cm²細胞培養フラスコ(Falcon社製)に抗ヒトCD3抗体(ヤンセン協和社製)(終濃度5μg/ml)を含むPBSを1ml(24穴プレートの場合)または2ml(12.5cm²フラスコの場合)ずつ添加した。この時、FNフラグメント添加群には製造例1に記載の各フィプロネクチンフラグメント(FNfr)を終濃度10μg/ml(24穴プレートの場合)または25μg/ml(12.5cm²フラスコの場合)となるように添加した。対照として、FNfrを添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで4℃で保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを吸引除去後、各ウェルをPBSで2回、XIVO20培地(Biowhittaker社製)で1回洗浄し各実験に供した。

【0120】

(3) LAK細胞の誘導および培養

1%Human AB血清を含むXIVO20(以下1%XIVO20と略す)に1×10⁶cells/mlとなるように実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例1-(2)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化プレートに1ml/ウェルずつまき、終濃度1000U/mlとなるようにIL-2(塩野義製薬社製)を添加した。これらのプレートを5%CO₂中37℃で培養した(培養0日目)。培養開始後2日目、3日目には1000U/mlのIL-2を含む1%XIVO20を1ml/ウェルずつ添加した。培養開始後4日目には適宜1%XIVO20を用いて希釈した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養を継続し、2~3日毎に培養開始5日目と同様に適宜1%XIVO20を用いて希釈し終濃度300~500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始後11日目または15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表1に示す。

【0121】

【表1】

表1

血清濃度(%)	培養日数	フィプロネクチンフラグメント	拡大培養率
1	11日間	対照(FNfr非固定化)	×252
1	11日間	CH-296	×670
1	11日間	H-296	×615.6
1	15日間	対照(FNfr非固定化)	×403.2
1	15日間	CH-296	×588
1	15日間	H-296	×708

【0122】

表1に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィプロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らか

となつた。

【0123】

実施例2 低血清培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（繰り返し刺激による拡大培養）

(1) LAK細胞の誘導および培養

0.5%または1%XVIVO20に 1×10^6 cells/mlとなるように実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例1-(2)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化プレートに1ml/ウェルずつまき、終濃度1000U/mlとなるようにIL-2（塩野義製薬社製）を添加した。これらのプレートを5%CO₂中37°Cで培養した（培養0日目）。培養開始後2日目、3日目には1000U/mlのIL-2を含む0.5%または1%XVIVO20を1ml/ウェルずつ添加した。培養開始後4日目には適宜0.5%または1%XVIVO20を用いて希釀した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始9日目には実施例1-(2)と同様の方法で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコ（ただし、固定化に用いる抗ヒトCD3抗体の濃度は0.5μg/mlとした）に適宜0.5%または1%XVIVO20を用いて希釀した培養液を移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始12日目に再度適宜0.5%または1%XVIVO20を用いて希釀した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表2に示す。

【0124】

【表2】

表2	血清濃度 (%)	フィプロネクチン フラグメント	培養開始0日目 刺激	培養開始9日目 刺激	拡大培養率 (倍率)
0.5	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし		×13
0.5	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3		×88
0.5	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296		×410
1	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし		×403
1	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3		×1624
1	CH-296	抗CD3+CH-296	なし		×588
1	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296		×3560
1	H-296	抗CD3+H-296	なし		×708
1	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296		×3000

【0125】

表2に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィプロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。これらの拡大培養率は、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗CD3抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における拡大培養率よりもはるかに高いものであった。すなわちLAK細胞誘導初期および中期にフィプロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を用いて刺激することにより、低濃度の血清を含んだ培地を用いた場合でも高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0126】

実施例3 低血清培地を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2レセプター (IL-2R) 発現の誘導

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例2-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

【0127】

(2) LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例3-(1)で調製した 2×10^5 cellsのLAK細胞を1%パラホルムアルデヒド(ナカライトスク社製)を含むPBS(ニッスイ社製)を用いて固定した後、PBSで洗浄した。固定細胞を1%BSA(SIGMA社製)を含む $100\mu l$ のPBS中に懸濁し、FITC標識マウスIgG1もしくはFITC標識マウス抗ヒトIL-2R(CD25)抗体(ともにDAKO社製)を添加後、氷上で30分間インキュベートした。インキュベート後、細胞をPBSで洗浄し、再度1%パラホルムアルデヒドを含むPBSに懸濁した。この細胞をFACSVantage(ベクトン・ディッキンソン社製)を用いたフローサイトメトリーに供し、IL-2R発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表3に示す。かかる表ではIL-2R発現陽性細胞含有率(%)をIL-2R発現率(%)と表示する。

【0128】

【表3】

表3

血清濃度 (%)	フィプロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	IL-2R発現率 (%)
0.5	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	3.48
0.5	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	43.22
0.5	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	81.11
0.5	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	71.49
1	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	8.02
1	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	42.8
1	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	5.91
1	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	77.94
1	H-296	抗CD3+H-296	なし	8.94
1	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	70.29

【0129】

表3に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導初期および中期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィプロネクチンフラグメントを共存させることにより、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0130】

実施例4 低血清培地を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例2-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

【0131】

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(1)で調製した 2×10^5 cellsのLAK細胞を1%パラホルムアルデヒド(ナカライトスク社製)を含むPBS(ニッスイ社製)を用いて固定した後、PBSで洗浄した。固定細胞を1%BSA(SIGMA社製)を含む $100\mu l$ のPBS中に懸濁し、FITC標識マウスIgG1もしくはFITC標識マウス抗ヒトCD8抗体(ともにDAKO社製)を添加後、氷上で30分間インキュベートした。インキュベート後、細胞をPBSで洗浄し、再度1%パラホルムアルデヒドを含むPBSに懸濁した。この細胞をFACSVantage(ベクトン・ディッキンソン社製)を用いたフローサイトメトリーに供し、CD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表4に示す。

【0132】
【表4】

表4

血清濃度 (%)	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	CD8陽性細胞 含有率(%)
0.5	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	抗CD3	26.95
0.5	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	44.67
1	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	53.26
1	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	35.56
1	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	61.29
1	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	62.58

【0133】

表4に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導初期または初期中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0134】

実施例5 無血清培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定

(1) LAK細胞の誘導および培養

血清を含まないXVIVO20(以下0%XVIVO20と略す)に 1×10^6 cell¹s/m¹となるように実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例1-(2)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化プレートに1m¹/ウェルずつまき、終濃度1000U/m¹となるようにIL-2(塩野義製薬社製)を添加した。これらのプレートを5%CO₂中37℃で培養した(培養0日目)。培養開始後2日目、3日目には1000U/m¹のIL-2を含む0%XVIVO20を1m¹/ウェルずつ添加した。培養開始後4日目には適宜0%XVIVO20を用いて希釈した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500U/m¹となるようIL-2を添加した。培養を継続し、2~3日毎に培養開始5日目と同様に適宜0%XVIVO20を用いて希釈し終濃度300~500U/m¹となるようIL-2を添加した。培養開始後11日目または15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表5に示す。

【0135】

【表5】

表5

血清濃度(%)	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率(倍率)
0	11日間	対照(FNfr非固定化)	36
0	11日間	CH-296	103.7
0	15日間	対照(FNfr非固定化)	76.3
0	15日間	CH-296	134.6
0	15日間	対照(FNfr非固定化)	28.8
0	15日間	H-296	46.8

【0136】

表5に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは血清

を含まない培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0137】

実施例6 無血清培地でのLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（繰り返し刺激による拡大培養）

(1) LAK細胞の誘導および培養

0%XVIVO20に 1×10^6 cells/mlとなるように実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例1-(2)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化プレートに1ml/ウェルずつまき、終濃度1000U/mlとなるようにIL-2（塩野義製薬社製）を添加した。これらのプレートを5%CO₂中37℃で培養した（培養0日目）。培養開始後2日目、3日目には1000U/mlのIL-2を含む0%XVIVO20を1ml/ウェルずつ添加した。培養開始後4日目には適宜0%XVIVO20を用いて希釈した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始9日目には実施例1-(2)と同様の方法で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコ（ただし、固定化に用いる抗ヒトCD3抗体の濃度は0.5μg/mlとした）に適宜0%XVIVO20を用いて希釈した培養液を移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始12日目に再度適宜0%XVIVO20を用いて希釈した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表6に示す。

【0138】

【表6】

表6

血清濃度 (%)	フィプロネクチン フラグメント	培養開始0日目 刺激	培養開始9日目 刺激	拡大培養率 (倍率)
0	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	×2.9
0	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	×3.6
0	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	×5.6
0	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×1.99
0	H-296	抗CD3+H-296	なし	×4.7
0	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	×2.09

【0139】

表6に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィプロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。これらの拡大培養率は、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗CD3抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における拡大培養率よりもはるかに高いものであった。すなわちLAK細胞誘導初期および中期にフィプロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を用いて刺激することにより、血清を含まない培地を用いた場合でも高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0140】

実施例7 無血清培地を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2R発現の誘導

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例6-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

【0141】

(2) LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例3-(2)と同様の方法で、IL-2R発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表7に示す。かかる表ではIL-2R発現陽性細胞含有率(%)をIL-2R発現

率(%)と表示する。

【0142】

【表7】

表7

血清濃度 (%)	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	I L - 2 R 発現率 (%)
0	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	1.7
0	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	50.5
0	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	3.0
0	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	82.2
0	H-296	抗CD3+H-296	なし	3.2
0	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	91.9

【0143】

表7に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期および中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわち血清を含まない培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0144】

実施例8 無血清培地 (AIMV) を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定
(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例5-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を血清を含まないAIMV培地 (インビトロジェン社製、以下0%AIMVと略す)に変更した。結果を表8に示す。

【0145】

【表8】

表8

血清濃度・培地	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率(倍率)
0%AIMV	12日間	対照 (FNfr非固定化)	×21
0%AIMV	12日間	CH-296	×110
0%AIMV	15日間	対照 (FNfr非固定化)	×44
0%AIMV	15日間	CH-296	×498
0%AIMV	12日間	対照 (FNfr非固定化)	×0
0%AIMV	12日間	H-296	×33
0%AIMV	15日間	対照 (FNfr非固定化)	×0
0%AIMV	15日間	H-296	×245

【0146】

表8に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。またこの効果は無血清培養用の基本培地を変えても発揮される。このことから各フィブロネクチンフラグメントは血清を含まない培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0147】

実施例9 無血清培地でのLAK細胞培養系における拡大培養率の測定 (低細胞数からのLAK細胞誘導・培養/希釈操作なしでの培養)

(1) LAK細胞の誘導および培養

X V I V O 2 0 (血清を含まない) に 1×10^5 cells/ml となるように実施例

出証特2004-3085985

1-(1)で調製したPBM Cを懸濁後、実施例1-(2)と同様の方法で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化6ウェルプレートに1ml/ウェルずつまき、XVIVO20(血清を含まない)4mlを加え(1×10⁴ cells/cm²)、さらに終濃度500U/mlとなるようにIL-2(塩野義製薬社製)を添加した。これらのプレートを5%CO₂中37℃で培養した(培養0日目)。培養開始後2日目、3日目、4日目には終濃度500U/mlとなるようにIL-2を添加した。培養を継続し、培養開始後7日目以降2~3日毎に終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。この間培養液の希釈操作は全く行わなかった。

培養開始後15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率を算出した。結果を表9に示す。

【0148】

【表9】

表9

培養日数	フィプロネクチンフラグメント	拡大培養率(倍率)
15日間	対照(FNfr非固定化)	増殖しないため測定不可能
15日間	CH-296	×64.3

【0149】

表9に示されるように、低細胞数からのLAK細胞誘導時に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、誘導途中の細胞の希釈操作を必要とすることなしに培養開始後15日目に高い拡大培養率が得られた。これに対して対照群では培養開始15日目でもほとんど増殖しなかった。すなわち無血清培地を用いて低細胞数からLAK細胞を誘導する際にフィプロネクチンフラグメントを共存させることにより、全く希釈操作を必要とすることなく、高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0150】

実施例10 無血清培地を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2R発現の誘導(低細胞数からのLAK細胞誘導・培養/希釈操作なしでの培養)

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例9-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

【0151】

(2) LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例3-(2)と同様の方法で、IL-2R発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表10に示す。かかる表ではIL-2R発現陽性細胞含有率(%)をIL-2R発現率(%)と表示する。

【0152】

【表10】

表10

培養日数	フィプロネクチンフラグメント	IL-2R発現率(%)
15日間	対照(FNfr非固定化)	増殖しないため測定不可能
15日間	CH-296	98.0

【0153】

表10に示されるように、低細胞数からのLAK細胞誘導時に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、誘導途中の細胞の希釈操作を必要とすることなしに培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわち無血清培地を用いて低細胞数からLAK細胞を誘導する際にフィプロネクチンフラグメントを共存させることにより、全く希釈操作を必要とすることなく、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0154】

実施例11 無血清培地（AIMV）を用いて培養したLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例8-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

【0155】

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表11に示す。

【0156】

【表11】

表11

血清濃度・培地	フィプロネクチンフラグメント	CD8陽性細胞含有率 (%)
0%AIMV	対照 (FNfr非固定化)	24.7
0%AIMV	CH-296	45.8
0%AIMV	H-296	62.6

【0157】

表11に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち血清を含まない培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィプロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0158】

実施例12 低血清培地（AIMV）を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を1%または5%HumanAB血清を含むAIMV培地（インビトロジエン社製、以下1%AIMVまたは5%AIMVと略す）に変更した。結果を表12に示す。

【0159】

【表12】

表12

血清濃度・培地	培養日数	フィプロネクチンフラグメント	拡大培養率(倍率)
1%AIMV	11日間	対照 (FNfr非固定化)	×7
1%AIMV	11日間	CH-296	×156
1%AIMV	11日間	H-296	×39
1%AIMV	15日間	対照 (FNfr非固定化)	×3
1%AIMV	15日間	CH-296	×651
1%AIMV	15日間	H-296	×305
5%AIMV	11日間	対照 (FNfr非固定化)	×454
5%AIMV	11日間	CH-296	×1087
5%AIMV	11日間	H-296	×727
5%AIMV	15日間	対照 (FNfr非固定化)	×778
5%AIMV	15日間	CH-296	×1548
5%AIMV	15日間	H-296	×882

【0160】

表12に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地（AIMV）を用いてのLAK細胞

出証特2004-3085985

胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだAIMV培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0161】

実施例13 種々の低血清培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の効果

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を1%HumanAB血清を含むXIVO20培地・XIVO10培地またはAIMV培地(以下それぞれ1%XIVO20・1%XIVO10または1%AIMVと略す)に変更し、各培地における拡大培養率を測定した。結果を表13に示す。

【0162】

【表13】

表13

血清濃度・培地	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率(倍率)
1%XIVO20	11日間	対照(FNfr非固定化)	×49
1%XIVO20	11日間	CH-296	×153
1%AIMV	11日間	対照(FNfr非固定化)	×79
1%AIMV	11日間	CH-296	×832
1%XIVO20	15日間	対照(FNfr非固定化)	×272
1%XIVO20	15日間	CH-296	×513
1%XIVO10	15日間	対照(FNfr非固定化)	×113
1%XIVO10	15日間	CH-296	×162
1%AIMV	15日間	対照(FNfr非固定化)	×744
1%AIMV	15日間	CH-296	×8928

【0163】

表13に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。またこの効果は基本培地を変えて発揮される。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだいずれの培地を用いたLAK細胞培養時にも好適に使用されることが明らかとなった。

【0164】

実施例14 低血清培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を0.2%HumanAB血清を含むXIVO20培地に変更した。結果を表14に示す。

【0165】

【表14】

表14

血清濃度・培地	培養日数	フィブロネクチン フラグメント	拡大培養率 (倍率)
0.2%XIVO20	15日間	対照(FNfr非固定化)	×11
0.2%XIVO20	15日間	CH-296	×67

【0166】

表14に示されるように、低濃度(0.2%)の血清を含んだ培地(XIVO20)を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことか

ら各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0167】

実施例15 低血清培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（繰り返し刺激による拡大培養）

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例2-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を0.2%HumanAB血清を含むXVIVO20培地または1%HumanAB血清を含むXVIVO10に変更した。結果を表15に示す。

【0168】

【表15】

表15

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日目刺 激	拡大培養率 (倍率)
0.2%XVIVO20	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	×11
0.2%XVIVO20	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	×9
0.2%XVIVO20	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×86
1%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	×113
1%XVIVO10	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	×281
1%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×1282
1%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	×24
1%XVIVO10	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	×367
1%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×1030
1%XVIVO10	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	×1001

【0169】

表15に示されるように、低濃度の血清(0.2%)を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。これらの拡大培養率は、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗CD3抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における拡大培養率よりもはるかに高いものであった。またこの効果は基本培地を変えても発揮される。すなわちLAK細胞誘導初期および中期にフィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を用いて刺激することにより、低濃度の血清を含んだ培地を用いた場合でも高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0170】

実施例16 低血清培地を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2レセプター(IL-2R)発現の誘導

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例2-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を0.2%HumanAB血清を含むXVIVO20培地または1%HumanAB血清を含むXVIVO10に変更した。

【0171】

(2) LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例3-(2)と同様の方法で、IL-2R発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表16に示す。かかる表ではIL-2R発現陽性細胞含有率(%)をIL-2R発現率(%)と表示する。

【0172】

【表16】

表16

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	IL-2R発 現率 (%)
0.2%XVIVO20	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	3.01
0.2%XVIVO20	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	59.08
0.2%XVIVO20	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	77.88
1%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	13.77
1%XVIVO10	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	58.28
1%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	91.11

【0173】

表16に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導初期および中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。またこの効果は基本培地を変えて発揮される。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0174】

実施例17 低血清培地を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を0.2%もしくは1%HumanAB血清を含むXVIVO20培地または1%HumanAB血清を含むXVIVO10に変更した。

【0175】

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表17に示す。

【0176】

【表17】

表17

血清濃度・培地	フィブロネクチンフラグメント	CD8陽性細胞含有率 (%)
0.2%XVIVO20	対照 (FNfr非固定化)	50.9
0.2%XVIVO20	CH-296	70.9
1%XVIVO20	対照 (FNfr非固定化)	36.2
1%XVIVO20	CH-296	53.6
1%XVIVO20	H-296	50.6
1%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	19.9
1%XVIVO10	CH-296	45.5
1%XVIVO10	H-296	53.6

【0177】

表17に示されるように、低血清を含む培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。またこの効果は基本培地を変えて発揮された。すなわち低濃度の血清を含む培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0178】

実施例18 低血清培地を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率（繰り返し刺激による拡大培養）

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例2-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を0.2%Human AB血清を含むXVIVO20培地または1%Human AB血清を含むXVIVO10に変更した。

【0179】

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表18に示す。

【0180】

【表18】

表18

血清濃度・培地	フィプロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	CD8陽性細胞含有率(%)
0.2%XVIVO20	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	抗CD3	38.9
0.2%XVIVO20	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	44.5
1%XVIVO10	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	抗CD3	25.6
1%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	38.3

【0181】

表18に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導初期または中期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。またこの効果は基本培地を変えても發揮された。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィプロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0182】

実施例19 無血清培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例5-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を血清を含まないXVIVO10培地またはAIMV培地に変更した。結果を表19に示す。

【0183】

【表19】

表19 血清濃度・培地	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率 (倍率)
0%XVIVO10	11日間	対照 (FNfr非固定化)	×32
0%XVIVO10	11日間	CH-296	×95
0%XVIVO10	15日間	対照 (FNfr非固定化)	×205
0%XVIVO10	15日間	CH-296	×407
0%XVIVO10	11日間	対照 (FNfr非固定化)	×29
0%XVIVO10	11日間	H-296	×78
0%XVIVO10	15日間	対照 (FNfr非固定化)	×27
0%XVIVO10	15日間	H-296	×194
0%AIMV	11日間	対照 (FNfr非固定化)	×25
0%AIMV	11日間	CH-296	×85
0%AIMV	11日間	H-296	×69
0%AIMV	15日間	対照 (FNfr非固定化)	×61
0%AIMV	15日間	CH-296	×202
0%AIMV	15日間	H-296	×392

【0184】

表19に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。またこの効果は基本培地を変えても発揮された。このことから各フィブロネクチンフラグメントは血清を含まない培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0185】

実施例20 無血清培地でのLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（繰り返し刺激による拡大培養）

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例6-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を血清を含まないXVIVO10培地に変更した。結果を表20に示す。

【0186】

【表20】

表20 血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	拡大培養率 (倍率)
0%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	×27
0%XVIVO10	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	×288
0%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×845
0%XVIVO10	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	×893

【0187】

表20に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。これらの拡大培養率は、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗CD3抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における拡大培養率よりもはるかに高いものであった。またこの効果は基本培地を変えても発揮された。すなわちLAK細胞誘導初期および中期にフィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を用いて刺激することにより、血清を含まない培地を用いた場合でも高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0188】

実施例21 無血清培地を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2R発現の誘導

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例6-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を血清を含まないXVIVO10培地に変更した。

【0189】

(2) LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例3-(2)と同様の方法で、IL-2R発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表21に示す。かかる表ではIL-2R発現陽性細胞含有率(%)をIL-2R発現率(%)と表示する。

【0190】

【表21】

表21

血清濃度・培地	フィプロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	IL-2R発現率(%)
0%XVIVO10	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	24.99
0%XVIVO10	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	80.58
0%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	40.17
0%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	92.59
0%XVIVO10	H-296	抗CD3+H-296	なし	30.09
0%XVIVO10	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	87.15

【0191】

表21に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期および中期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわち血清を含まない培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィプロネクチンフラグメントを共存させることにより、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0192】

実施例22 無血清培地を用いて培養したLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例5-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を血清を含まないXVIVO20またはXVIVO10またはAIMV培地に変更した。

【0193】

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。

結果を表22に示す。

【0194】

【表22】

表22

血清濃度・培地	フィブロネクチンフラグメント	CD8陽性細胞含有率 (%)
0%XVIVO20	対照 (FNfr非固定化)	20.01
0%XVIVO20	CH-296	64.48
0%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	27.91
0%XVIVO10	CH-296	47.72
0%AIMV	対照 (FNfr非固定化)	21.14
0%AIMV	CH-296	58.8
0%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	16.53
0%XVIVO10	CH-296	35.22
0%XVIVO10	H-296	27.29

【0195】

表22に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。またこの効果は基本培地を変えても発揮された。すなわち血清を含まない培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0196】

実施例23 無血清培地を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率（繰り返し刺激による拡大培養）

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例6-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を血清を含まないXVIVO20またはXVIVO10培地に変更した。

【0197】

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表23に示す。

【0198】

【表23】

表23

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	CD8陽性細胞含有率 (%)
0%XVIVO20	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	20.01
0%XVIVO20	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	64.48
0%XVIVO20	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	0.29
0%XVIVO20	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	35.21
0%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	27.91
0%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	47.72
0%XVIVO10	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	37.97
0%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	50.22
0%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	16.53
0%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	35.22
0%XVIVO10	H-296	抗CD3+H-296	なし	27.29
0%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	75.33
0%XVIVO10	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	61.08

【0199】

表23に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期または初期中期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。またこの効果は基本培地を変えて発揮された。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィプロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0200】

実施例24 低血清培地を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2R発現の誘導（低細胞数からのLAK細胞誘導・培養／希釈操作なしでの培養）

(1) LAK細胞の誘導および培養

(1) LAK細胞の誘導および培養

1%ヒトAB血清を含むXVIVO20（以下1%XVIVO20と省略）に 1×10^5 cells/m¹または 5×10^4 cells/m¹となるように実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例1-(2)と同様の方法で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化6ウェルプレートに $1 \text{m}^1/\text{ウェル}^2$ ずつまき、1%XVIVO20 4m^1 を加え（ 1×10^4 cells/cm²または 5×10^3 cells/cm²）、さらに終濃度500U/m¹となるようにIL-2（塩野義製薬社製）を添加した。これらのプレートを5%CO₂中37℃で培養した（培養0日目）。培養開始後2日目、3日目、4日目には終濃度500U/m¹となるようにIL-2を添加した。培養を継続し、培養開始後7日目以降2～3日毎に終濃度500U/m¹となるようIL-2を添加した。この間培養液の希釈操作は全く行わなかった。培養開始後16日目に細胞を回収した。

【0201】

(2) LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例3-(2)と同様の方法で、IL-2R発現陽性細胞含有率を測定した。かかる表ではIL-2R発現陽性細胞含有率（%）をIL-2R発現率（%）と表示する。結果を表24に示す。

【0202】

【表24】

表24

血清濃度・培地	フィプロネクチンフラグメント	IL-2R発現率（%）
1%XVIVO20	対照 (FNfr非固定化)	12.15
	CH-296	97.47
	H-296	95.43

【0203】

表24に示されるように、低細胞数からのLAK細胞誘導時に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、誘導途中の細胞の希釈操作を必要とすることなしに培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわち低血清培地を用いて低細胞数からLAK細胞を誘導する際にフィプロネクチンフラグメントを共存させることにより、全く希釈操作を必要とすることなく、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0204】

実施例25 無血清・低血清培地を用いたLAK細胞培養系における細胞傷害活性の測定

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を0%から5%HumanAB血清を含むXVIVO20または0%から5%HumanA

B血清を含むAIMV培地または5%HumanAB血清を含むXVIVO10培地に変更した。

【0205】

(2) 培養したLAK細胞の細胞傷害活性の測定

実施例25-(1)で調製した培養後15日目のLAKの細胞傷害活性は、Calcein-AMを用いた細胞傷害活性測定法(リヒテンフェルズ R. ら(Lichtenfels R., et al.)、J. Immunol. Methods、第172巻、第2号、第227~239頁(1994))にて評価した。細胞株 K562、Dauidi、624me1を 1×10^6 cells/mlとなるよう5%FBS(Bio Whittaker社製)を含むRPMI1640培地に懸濁後、終濃度 $25 \mu M$ となるようCalcein-AM(ドータイト社製)を添加し、37℃で1時間培養した。細胞をCalcein-AMを含まない培地にて洗浄後、Calcein標識標的細胞とした。

実施例25-(1)で調製したLAK細胞をエフェクター細胞として $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ cells/mlとなるように5%ヒト血清を含むRPMI(以下5HRPMIと省略)で段階希釈後、96穴細胞培養プレートの各ウェルに $100 \mu l$ /ウェルずつ分注しておき、これらに 1×10^5 cells/mlに調製したCalcein標識標的細胞を $100 \mu l$ /ウェルずつ添加した。上記細胞懸濁液の入ったプレートを $400 \times g$ で1分間遠心後、37℃の湿式CO₂インキュベーター内で4時間インキュベートした。4時間後、各ウェルから培養上清 $100 \mu l$ を採取し、蛍光プレートリーダー(485 nm/538 nm)によって培養上清中に放出されたcalcein量(蛍光強度)を測定した。CTLの細胞傷害活性は以下の式1にしたがって算出した。

【0206】

式1：

細胞傷害活性(%) = [(各ウェルの測定値 - 最小放出量) / (最大放出量 - 最小放出量)] × 100

【0207】

上式において最小放出量は標的細胞のみ含有するウェルのcalcein放出量であり、標的細胞からのcalcein自然放出量を示す。また、最大放出量は標的細胞に界面活性剤であるTriton X-100(ナカライトスク社製)を終濃度0.05%となるように加えて細胞を完全破壊した際のcalcein放出量を示している。結果を表25に示す。

【0208】

【表25】

表25

血清濃度 ・培地	フィブロネクチン フラグメント	E/T	細胞傷害活性 (%) (標的細胞 K562)	細胞傷害活性 (%) (標的細胞 Daudi)
0%XVIVO20	対照 (FNfr非固定化)	20	28.7	13.3
0%XVIVO20	CH-296	20	46.7	23.8
0%XVIVO20	H-296	20	49.9	19.0
0.2%XVIVO20	対照 (FNfr非固定化)	10	13.3	11.6
0.2%XVIVO20	CH-296	10	18.2	18.6
1%XVIVO20	対照 (FNfr非固定化)	20	36.5	24.8
1%XVIVO20	H-296	20	62.8	39
5%XVIVO20	対照 (FNfr非固定化)	30	57.0	56.6
5%XVIVO20	CH-296	30	78.1	59.1
0%AIMV	対照 (FNfr非固定化)	30	25.2	23.4
0%AIMV	CH-296	30	36.8	28.1
5%AIMV	対照 (FNfr非固定化)	30	55.3	49.8
5%AIMV	CH-296	30	77.2	53.6
5%AIMV	対照 (FNfr非固定化)	10	35.1	50.5
5%AIMV	CH-296	10	71.6	51.8
5%AIMV	H-296	10	73.9	57.8
5%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	10	72.6	51.1
5%XVIVO10	CH-296	10	84.6	57.4
5%XVIVO10	H-296	10	89.3	69.5

【0209】

表25に示されるように、血清を含まない培地もしく低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の細胞傷害活性が高い。またこの効果は基本培地を変えても発揮された。このことから各フィブロネクチンフラグメントは血清を含まない培地または低濃度の血清を含んだ培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0210】

実施例2-6 低血清培地 (AIM-V) を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定 (繰り返し刺激による拡大培養) - 1

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例2- (1) と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を1%Human AB血清を含む培地AIM-Vに変更した。結果を表26に示す。

【0211】

【表26】

表26

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日目刺 激	拡大培養率 (倍率)
1%AIM-V	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	×461
1%AIM-V	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	×130
1%AIM-V	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×2419

【0212】

表26に示されるように、低濃度の血清 (1%) を含んだAIM-V培地を用いてのLAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡

大培養率が高い。これらの拡大培養率は、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗CD3抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における拡大培養率よりもはるかに高いものであった。すなわちLAK細胞誘導初期および中期にフィプロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を用いて刺激することにより、低濃度の血清を含んだ培地を用いた場合でも高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0213】

実施例27 低血清培地（AIM-V）を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（繰り返し刺激による拡大培養）-2

（1）抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材（容器）に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。すなわち12穴細胞培養プレートまたは12.5cm²細胞培養フラスコ（Falcon社製）に抗ヒトCD3抗体（終濃度5μg/ml）を含むPBSを1.9ml（12穴プレートの場合）または2ml（12.5cm²フラスコの場合）ずつ添加した。この時、FNフラグメント添加群には製造例1に記載の各フィプロネクチンフラグメント（FNfr）を終濃度10μg/ml（12穴プレートの場合）または25μg/ml（12.5cm²フラスコの場合）となるように添加した。対照として、FNfrを添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで4℃で保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを吸引除去後、各ウェルをPBSで2回、AIM-V培地で1回洗浄し各実験に供した。

【0214】

（2）LAK細胞の誘導および培養

1%AIM-Vに5×10⁵cells/mlとなるように実施例1-（1）で調製したPBMCを懸濁後、実施例27-（1）で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化プレートに1ml/ウェルずつまき、終濃度1000U/mlとなるようにIL-2を添加した。これらのプレートを5%CO₂中37℃で培養した（培養0日目）。培養開始後2、3日目には1000U/mlのIL-2を含む1%AIM-Vを1ml/ウェルずつ添加した。培養開始後4日目には培養液を何も固定化していない25cm²細胞培養フラスコ（Falcon社製）に移し、さらに1%AIM-V 7mlを添加し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始7日目には1%AIM-Vを用いて細胞濃度を2×10⁵cells/mlに調整した培養液の一部を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始9日目には実施例27-（1）と同様の方法で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコ（ただし、固定化に用いる抗ヒトCD3抗体の濃度は0.5μg/mlとした）に1%AIM-Vを用いて細胞濃度を2×10⁵cells/mlに調整した培養液の一部を移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始12日に再度適宜1%AIM-Vを用いて細胞濃度を2×10⁵cells/mlに調整した培養液の一部を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。同条件にてn=3で拡大培養を行い、その平均±標準偏差の各結果を表27に示す。

【0215】

【表27】

表27

血清濃度 ・培地	フィブロネクチン ・フラグメント	培養開始 0 日 目刺激	培養開始 9 日 目刺激	拡大培養率 (倍率)
1%AIM-V	対照 (FNfr 非固定化)	抗 CD3	なし	×3392±779
1%AIM-V	FNfr 非固定化	抗 CD3	抗 CD3	×4389±1234
1%AIM-V	CH-296	抗 CD3+CH-296	抗 CD3+CH-296	×8545±1328
				平均値±標準偏差

【0216】

表27に示されるように、低濃度の血清(1%)を含んだAIM-V培地を用いてのLAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。これらの拡大培養率は、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗CD3抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における拡大培養率よりもはるかに高いものであった。またこれらの効果は培養方法によらず効果が発揮された。すなわちLAK細胞誘導初期および中期にフィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を用いて刺激することにより、低濃度の血清を含んだ培地を用いた場合でも高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0217】

実施例28 無血清培地(AIM-V)を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率(繰り返し刺激による拡大培養)

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例2-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地をHuman AB血清を含まないAIM-Vに変更した。

【0218】

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表28に示す。

【0219】

【表28】

表28

血清濃度・培地	フィブロネクチン ・フラグメント	培養開始 0 日 目刺激	培養開始 9 日 目刺激	CD8陽性細胞含有率 (%)
0%AIM-V	対照 (FNfr 非固定化)	抗 CD3	なし	43.8
0%AIM-V	CH-296	抗 CD3+CH-296	なし	64.4
0%AIM-V	CH-296	抗 CD3+CH-296	抗 CD3+CH-296	76.6

【0220】

表28に示されるように、血清を含まないAIM-V培地を用いてのLAK細胞誘導初期または中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞後細胞集団におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0221】

実施例29 低血清培地(AIM-V)を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率(繰り返し刺激による拡大培養)

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例2-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を1%Human AB血清を含むAIM-Vに変更した。

【0222】

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表29に示す。

【0223】

【表29】

表29

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	CD8陽性細胞含有率(%)
1%AIM-V	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	39.2
1%AIM-V	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	抗CD3	60.0
1%AIM-V	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	49.2
1%AIM-V	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	71.0

【0224】

表29に示されるように、低濃度の血清を含んだAIM-V培地を用いてのLAK細胞誘導初期または中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養後のLAK細胞集団におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0225】

実施例30 無血清培地(AIM-V)を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2レセプター(IL-2R)発現の誘導

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例2-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地をHuman AB血清を含まないAIM-V培地に変更した。

【0226】

(2) LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例3-(2)と同様の方法で、IL-2R発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表30に示す。かかる表ではIL-2R発現陽性細胞含有率(%)をIL-2R発現率(%)と表示する。

【0227】

【表30】

表30

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	IL-2R発現率 (%)
0%AIM-V	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	22.0
0%AIM-V	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	抗CD3	39.9
0%AIM-V	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	19.9
0%AIM-V	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	51.9

【0228】

表30に示されるように、血清を含まないAIM-V培地を用いてのLAK細胞誘導初期および中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養後のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわち血清を含まない培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフ

ラグメントを共存させることにより、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0229】

実施例31 低血清培地（AIM-V）を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2レセプター（IL-2R）発現の誘導（繰り返し刺激による拡大培養）

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例2-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を1%HumanAB血清を含むAIM-V培地に変更した。

【0230】

(2) LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例3-(2)と同様の方法で、IL-2R発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表31に示す。かかる表ではIL-2R発現陽性細胞含有率（%）をIL-2R発現率（%）と表示する。

【0231】

【表31】

表31

血清濃度・培地	フィプロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	IL-2R発現率 (%)
1%AIM-V	対照（FNfr非固定化）	抗CD3	なし	23.6
1%AIM-V	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	27.2
1%AIM-V	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	69.1

【0232】

表31に示されるように、低濃度の血清を含んだAIM-V培地を用いてのLAK細胞誘導初期および中期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィプロネクチンフラグメントを共存させることにより、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0233】

実施例32 低血清培地（AIM-V）を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を1%HumanAB血清を含むAIM-V培地に変更した。

【0234】

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表32に示す。

【0235】

【表32】

表32

血清濃度・培地	フィプロネクチンフラグメント	CD8陽性細胞含有率（%）
1%AIM-V	対照（FNfr非固定化）	41.02
1%AIM-V	CH-296	56.78

【0236】

表32に示されるように、低血清を含むAIM-V培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち

低濃度の血清を含む培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィプロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0237】

実施例33 無血清・低血清培地を用いたLAK細胞培養系における細胞傷害活性の測定

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)または実施例2-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を0%または1%Human AB血清を含むXVIVO10、XVIVO20またはAIMV培地に変更した。

【0238】

(2) 培養したLAK細胞の細胞傷害活性の測定

実施例25-(2)と同様の方法で培養後15日目のLAKの細胞傷害活性を測定した。結果を表33に示す。

【0239】

【表33】

表33

血清濃度・培地	フィプロネクチン フラグメント	培養開始 0日目刺激	培養開始 9日目刺激	E/T	細胞傷害	細胞傷害
					活性(%) 標的細胞 K562	活性(%) 標的細胞 Daudi
0%XVIVO10	対照(FNfr 非固定化)	抗CD3	なし	10	11.88	10.84
0%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	10	19.55	26.23
1%AIM-V	対照(FNfr 非固定化)	抗CD3	なし	10	16.82	33.02
1%AIM-V	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	10	46.54	42.3
0%XVIVO20	対照(FNfr 非固定化)	抗CD3	抗CD3	10	24.5	13.3
0%XVIVO20	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	10	30.8	23.3
1%XVIVO20	対照(FNfr 非固定化)	抗CD3	抗CD3	10	18.5	13.9
1%XVIVO20	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	10	30.8	28.5
1%XVIVO10	対照(FNfr 非固定化)	抗CD3	抗CD3	10	13.8	8.4
1%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	10	33.0	31.8

【0240】

表33に示されるように、血清を含まない培地もしく低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導初期または初期および中期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の細胞傷害活性が高い。またこの効果は基本培地を変えても発揮された。このことから各フィプロネクチンフラグメントは血清を含まない培地または低濃度の血清を含んだ培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0241】

実施例34 低血清培地(XVIVO10)を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定(細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを用いた培養)

(1) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材(細胞培養用CO₂ガス透過性バッグ)に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。すなわち85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグ(Baxter社製)に抗ヒトCD3抗体(終濃度5μg/ml)を含むPBSを20mlずつ添加した。この時、FNフラグメント添加群には製造例1に記載の各フィプロネクチンフラグメント(FNfr)を終濃度42.5μg/mlとなるように添加した。対照として、FNfrを添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで4℃で保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを除去後、各バッグをPBS

で2回、1%Human AB血清を含むXVIVO10培地（以下1%XVIVO10と略す）で1回洗浄し各実験に供した。

【0242】

（2）LAK細胞の誘導および培養

1%XVIVO10に 1×10^6 cells/m1となるように実施例1-（1）で調製したPBMCを懸濁後、実施例34-（1）で調製した抗ヒトCD3抗体固定化細胞培養用CO₂ガス透過性バッグ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化細胞培養用CO₂ガス透過性バッグに10m1/バッグずつ細胞懸濁液を入れ、終濃度1000U/m1となるようにIL-2を添加した。これらの細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを5%CO₂中37℃で培養した（培養0日目）。培養開始後2日目には1000U/m1のIL-2を含む1%XVIVO10を20m1/バッグずつ添加した。培養開始4日目には終濃度500U/m1となるようIL-2を添加した。培養開始後6日目には1%XVIVO10を30m1/バッグずつ添加し、終濃度500U/m1となるようIL-2を添加した。培養開始後8日目には培養液の一部を適宜希釀した後、何も固定化していない85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグに移し、終濃度500U/m1となるようIL-2を添加した。培養開始11、13日目には終濃度500U/m1となるようIL-2を添加した。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表34に示す。

【0243】

【表34】

血清濃度・培地	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率（倍率）
1%XVIVO10	15日間	対照（FNfr非固定化）	×34
1%XVIVO10	15日間	CH-296	×101

【0244】

表34に示されるように、低濃度（1%）の血清を含んだ培地（XVIVO10）と細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地および細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0245】

実施例35 低血清培地（XVIVO10）を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせた培養）

（1）抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材（25cm²細胞培養用フラスコ）に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。すなわち25cm²細胞培養用フラスコ（コーニング社製）に抗ヒトCD3抗体（終濃度5μg/m1）を含むPBSを6m1ずつ添加した。この時、FNフラグメント添加群には実施例1に記載の各フィブロネクチンフラグメント（FNfr）を終濃度42.5μg/m1となるように添加した。対照として、FNfrを添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで4℃で保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを除去後、各フラスコをPBSで2回、1%Human AB血清を含むXVIVO10培地（以下1%XVIVO10と略す）で1回洗浄し各実験に供した。

【0246】

（2）LAK細胞の誘導および培養

1%XVIVO10に 1×10^6 cells/m1となるように実施例1-（1）で調

製したPBMCを懸濁後、実施例35-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコに3ml/フラスコずつ細胞懸濁液を入れ、終濃度1000U/mlとなるようにIL-2を添加した。これらのフラスコを5%CO₂中37℃で培養した(培養0日目)。培養開始後1日目または2日目には1000U/mlのIL-2を含む1%XIVO10を7ml/フラスコずつ添加した。以下抗CD3抗体土CH296刺激期間により2つの方法で培養した。(i) 培養開始後4日目に培養液をなにも固定化していない85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグに移した後、1%XIVO10を20ml/バッグずつ添加し終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加、さらに培養開始後6日目に1%XIVO10を30ml/バッグずつ添加後、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した(抗CD3抗体土CH296刺激期間4日間)。(ii) 培養開始4日目または5日に終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加し、培養開始後6日目に培養液をなにも固定化していない85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグに移した後、1%XIVO10を50ml/バッグずつ添加、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した(抗CD3抗体土CH296刺激期間6日間)。両条件とも培養開始後8日目には培養液の一部を適宜希釈した後、何も固定化していない85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグに移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始11、13日目には終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表35に示す。

【0247】

【表35】

表35

血清濃度・培地	抗CD3±CH296 刺激期間	培養日数	フィプロネクチン フラグメント	拡大培養率 (倍率)
1%XIVO10	4日間	15日間	対照(FNfr非固定化)	×235
1%XIVO10	4日間	15日間	CH-296	×498
1%XIVO10	6日間	15日間	対照(FNfr非固定化)	×425
1%XIVO10	6日間	15日間	CH-296	×690

【0248】

表35に示されるように、低濃度(1%)の血清を含んだ培地(XIVO10)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィプロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0249】

実施例36 低血清培地(AIM-V)を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定(細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

(1) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材(25cm²細胞培養用フラスコ)に実施例35-(1)と同様に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを除去後、各フラスコをPBSで2回、1%HumanAB血清を含むAIM-V培地(以下1%AIM-Vと略す)で1回洗浄し各実験に供した。

【0250】

(2) LAK細胞の誘導および培養

1% AIM-Vに 1×10^6 cells/m¹となるように実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例36-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコに3m¹/フラスコずつ細胞懸濁液を入れ、終濃度1000U/m¹となるようにIL-2を添加した。これらのフラスコを5%CO₂中37℃で培養した(培養0日目)。培養開始後1日目には1000U/m¹のIL-2を含む1%AIM-Vを7m¹/フラスコずつ添加した。培養開始後4日目には培養液を何も固定化していない85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグに移した後、1%AIM-Vを20m¹/バッグずつ添加し、終濃度500U/m¹となるようIL-2を添加した。培養開始6日目には1%AIM-Vを30m¹/バッグずつ添加し、終濃度500U/m¹となるようIL-2を添加した。培養開始後8日目には培養液の一部を適宜希釀した後、何も固定化していない85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグに移し、終濃度500U/m¹となるようIL-2を添加した。培養開始11、13日目には終濃度500U/m¹となるようIL-2を添加した。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表36に示す。

【0251】

【表36】

表36

血清濃度・培地	培養日数	フィプロネクチンフラグメント	拡大培養率(倍率)
1%AIM-V	15日間	対照(FNfr非固定化)	×327
1%AIM-V	15日間	CH-296	×566

【0252】

表36に示されるように、低濃度(1%)の血清を含んだ培地(AIM-V)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィプロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0253】

実施例37 低血清培地(XVIVO10)を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率(細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを用いた培養)

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例34-(2)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

【0254】

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表37に示す。

【0255】

【表37】

表37

血清濃度・培地	培養日数	フィプロネクチンフラグメント	CD8陽性細胞含有率(%)
1%XVIVO10	15日間	対照(FNfr非固定化)	45.7
1%XVIVO10	15日間	CH-296	61.6

【0256】

表37に示されるように、低濃度(1%)の血清を含んだ培地(XVIVO10)と細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを用いてのLAK細胞誘導初期に各フィプロネクチンフ

ラグメントを固定化した細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを使用した群においては、培養後のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。このことから各フィプロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地および細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0257】

実施例38 低血清培地(XVIVO10)を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率(細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例35-(2)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

【0258】

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表38に示す。

【0259】

【表38】

表38

血清濃度・培地	抗CD3±CH296 刺激期間	培養日数	フィプロネクチン フラグメント	CD8陽性細胞含有率(%)
1%XVIVO10	4日間	15日間	対照(FNfr非固定化)	58.1
1%XVIVO10	4日間	15日間	CH-296	70.3
1%XVIVO10	6日間	15日間	対照(FNfr非固定化)	58.3
1%XVIVO10	6日間	15日間	CH-296	72.7

【0260】

表38に示されるように、低濃度(1%)の血清を含んだ培地(XVIVO10)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、対照群に比較して培養後のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。このことから各フィプロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0261】

実施例39 低血清培地(AIM-V)を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定(培養開始時、継代時の濃度)

LAK細胞培養系における培養開始時および継代時の細胞濃度が拡大培養率に及ぼす影響を確認した。

培養開始時の細胞濃度として 0.5×10^6 cells/m¹および 1×10^6 cells/m¹を設定した。培養4日目の継代細胞濃度として、 0.25×10^5 cells/m¹および 0.05×10^6 cells/m¹を設定した。培養7、9および11日目の継代細胞濃度として、 0.2×10^6 cells/m¹および 0.5×10^6 cells/m¹を設定した。下記表39-1に上記パターンを示す。

【0262】

【表39-1】

表39-1

	培養開始時濃度	培養4日目濃度	培養7、9、11日目濃度
細胞濃度パターン1	0. 500	0. 025	0. 2
細胞濃度パターン2	0. 500	0. 05	0. 2
細胞濃度パターン3	0. 500	0. 05	0. 5
細胞濃度パターン4	1. 000	0. 025	0. 2
細胞濃度パターン5	1. 000	0. 05	0. 2
細胞濃度パターン6	1. 000	0. 05	0. 5

* 細胞濃度 ($\times 10^6$ cells/mL)

【0263】

(1) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材（容器）に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。すなわち24穴細胞培養プレートに抗ヒトCD3抗体（終濃度5 μ g/mL）を含むPBSを1mLずつ添加した。この時、FNフラグメント添加群には製造例1に記載のフィプロネクチンフラグメント（CH296）を終濃度25 μ g/mLとなるように添加した。対照として、CH296を添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで4℃で保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗ヒトCD3抗体・CH296を含むPBSを吸引除去後、各ウェルをPBSで2回、RPMI培地で1回洗浄し各実験に供した。

【0264】

(2) LAK細胞の誘導および培養

1%のヒトAB型血清を含むAIM-Vに細胞濃度パターン1、2および3で培養する区分は 0.5×10^6 cells/mLとなるように、細胞濃度パターン4、5および6で培養する区分は 1×10^6 cells/mLとなるように実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびCH296固定化プレートに1mL/ウェルずつまき、終濃度1000U/mLとなるようにIL-2を添加した。これらのプレートを5%CO₂中37℃で培養した（培養0日目）。培養開始後2、3日目には1000U/mLのIL-2を含む1%AIM-Vを1mL/ウェルずつ添加した。

培養開始後4日目に細胞濃度パターン1および4で培養する区分は、 0.025×10^6 cells/mLとなるように、また細胞濃度パターン2、3、5、6で培養する区分は、 0.05×10^6 cells/mLとなるように1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量最大6mL）、何も固定化していない12.5cm²細胞培養フラスコにそれぞれ移した。各区分において終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。

培養開始後7、9および11日目には細胞濃度パターン1、2、4および5で培養する区分は、 0.2×10^6 cells/mLとなるように、また細胞濃度パターン3、6で培養する区分は、 0.5×10^6 cells/mLとなるように1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量最大6mL）、何も固定化していない12.5cm²細胞培養フラスコにそれぞれ移した。各区分において終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。

培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。各実験は3連で行った。その平均の各結果を表39-2に示す。

【0265】

【表39-2】

表39-2

細胞濃度パターン	培養開始0日目刺激		拡大培養率(倍率)
	抗CD3	抗CD3+CH296	
1	抗CD3	1427	
	抗CD3+CH296	2649	
2	抗CD3	3401	
	抗CD3+CH296	3691	
3	抗CD3	749	
	抗CD3+CH296	2508	
4	抗CD3	256	
	抗CD3+CH296	436	
5	抗CD3	1091	
	抗CD3+CH296	1179	
6	抗CD3	n. t.	
	抗CD3+CH296	476	

n. t. : not tested

【0266】

表39-2に示されるように、培養開始時および継代時において種々の細胞濃度でのLAK細胞培養において、いずれの細胞濃度区分においても、対照群（抗CD3抗体のみによる刺激）と比較してCH296および抗CD3抗体により刺激した群において高い拡大培養率が得られた。すなわち、諸状況下で変化しうる培養開始時および継代時の細胞濃度に対して、CH296により刺激することにより、明らかに高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養できることが示された。

【0267】

実施例40 低血清培地（AIMV）を用いて培養したLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率（培養開始時、継代時の濃度）

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例39と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

【0268】

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表40に示す。

【0269】

【表40】

表40

細胞濃度パターン	培養開始0日目刺激	CD8陽性細胞含有率 (%)
1	抗CD3	55
	抗CD3+CH296	63
2	抗CD3	62
	抗CD3+CH296	73
3	抗CD3	71
	抗CD3+CH296	75
4	抗CD3	56
	抗CD3+CH296	70
5	抗CD3	61
	抗CD3+CH296	70
6	抗CD3	n. t.
	抗CD3+CH296	76

n. t.: not tested

【0270】

表40に示されるように、培養開始時および継代時において種々の細胞濃度でのLAK細胞培養において、いずれの細胞濃度区分においても、対照群（抗CD3抗体のみによる刺激）と比較してCH296および抗CD3抗体により刺激した群において培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち、諸状況下で変化しうる培養開始時および継代時の細胞濃度に対して、CH296により刺激することにより、明らかにLAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0271】

実施例41 低血清培地（AIM-V）を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（高濃度・高密度培養）

LAK細胞培養系において、最終培養液量および最終培養面積を極力抑えることができれば、培地、資材および労力を低減することができる。細胞を高濃度、高密度で培養したときの拡大培養率に及ぼす影響を確認した。

継代時の細胞濃度および細胞密度を抑えない区分（普通培養区分）、培養7および10日目の継代時の細胞濃度を普通培養区分のそれぞれ1.8倍および約6倍にした区分（高濃度培養区分、ただし細胞密度は濃度に比例して同じく1.8倍および約6倍となる）、培養7および10日目の継代時の細胞濃度を普通培養区分のそれぞれ1.3倍および約2.5倍に、かつ細胞密度をそれぞれ約3.9倍および7.5倍にした区分（高濃度・高密度培養区分）を設定した。下記表41-1に上記各群での継代時細胞濃度および細胞密度を示す。

【0272】

【表41-1】

表41-1

		培養0日目	培養4日目	培養7日目	培養10日目
普通培養区分	細胞濃度 ($\times 10^6$ cells/mL)	0.333	0.050	0.100	0.15
	細胞密度 ($\times 10^6$ cells/cm ²)	0.263	0.024	0.048	0.072
高濃度培養区分	細胞濃度 ($\times 10^6$ cells/mL)	0.333	0.050	0.180	0.893
	細胞密度 ($\times 10^6$ cells/cm ²)	0.263	0.024	0.086	0.429
高濃度・高密度培養区分	細胞濃度 ($\times 10^6$ cells/mL)	0.333	0.050	0.13	0.38
	細胞密度 ($\times 10^6$ cells/cm ²)	0.263	0.024	0.186	0.543

【0273】

(1) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材（容器）に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。すなわち12穴細胞培養プレートに抗ヒトCD3抗体（終濃度5 μ g/mL）を含むPBSを1.9mLずつ添加した。この時、FNフラグメント添加群には製造例1に記載のフィブロネクチンフラグメント（CH296）を終濃度25 μ g/mLとなるように添加した。対照として、CH296を添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで4°Cで保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗ヒトCD3抗体・CH296を含むPBSを吸引除去後、各ウェルをPBSで2回、RPMI培地で1回洗浄し各実験に供した。

【0274】

(2) LAK細胞の誘導および培養

各培養区分とも1%のヒトAB型血清を含むAIM-Vに 0.33×10^6 cells/mLとなるように、実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびCH296固定化プレートに3mL/ウェルずつまき、終濃度1000U/mLとなるようにIL-2を添加した。これらのプレートを5%CO₂中37°Cで培養した（培養0日目）。

培養開始後4日目に各培養区分とも、 0.05×10^6 cells/mLとなるように1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量最大6mL）、何も固定化していない12.5cm²細胞培養フラスコに移した。各区分において終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。

培養開始後7日目には、普通培養区分は 0.1×10^6 cells/mLとなるように、高濃度培養区分は 0.18×10^6 cells/mLとなるように1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量最大6mL）、何も固定化していない12.5cm²細胞培養フラスコに移した。また、高濃度・高密度培養区分は 0.13×10^6 cells/mLとなるように1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量最大9mL）、何も固定化していない25cm²細胞培養フラスコを立てたものに移した。各区において終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。

培養開始後10日目には、普通培養区分は 0.15×10^6 cells/mLとなるように、高濃度培養区分は 0.893×10^6 cells/mLとなるように1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量最大6mL）、何も固定化していない12.5cm²細胞培養フラスコに移した。また、高濃度・高密度培養区分は 0.38×10^6 cells/mLとなるように1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量最大9mL）、何も固定化していない25cm²細胞培養フラスコを立てたものに移した。

各区分において終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。

培養開始後11日目には各区分に終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。

培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。各実験は2連で行った。その平均の各結果を4-2に示す。

【0275】

【表41-2】

表41-2

	培養開始0日目刺激	拡大培養率（倍率）
普通培養区分	抗CD3	601
	抗CD3+CH296	2325
高濃度培養区分	抗CD3	112
	抗CD3+CH296	1131
高濃度・高密度培養区分	抗CD3	215
	抗CD3+CH296	1307

【0276】

表41-2に示されるように、普通培養区分あるいは高濃度培養区分あるいは高濃度・高密度培養区分において、いずれの区分においても、対照群（抗CD3抗体のみによる刺激）と比較してCH296および抗CD3抗体により刺激した群において高い拡大培養率が得られた。すなわち、培地、資材および労力を低減することができる高濃度・高密度培養においてCH296による刺激により明らかに拡大培養に対する効果が認められた。

【0277】

実施例4-2 低血清培地（AIMV）を用いて培養したLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率（培養開始時、継代時の濃度）

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例4-1と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

【0278】

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-（2）と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表4-2に示す。

【0279】

【表42】

表42

	培養開始0日目刺激	CD8陽性細胞含有率（%）
普通培養区分	抗CD3	53
	抗CD3+CH296	63
高濃度培養区分	抗CD3	55
	抗CD3+CH296	72
高濃度・高密度培養区分	抗CD3	63
	抗CD3+CH296	65

【0280】

表4-2に示されるように、普通培養区分あるいは高濃度培養区分あるいは高濃度・高密度培養区分において、いずれの区分においても、対照群（抗CD3抗体のみによる刺激）と比較してCH296および抗CD3抗体により刺激した群において培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち、培地、資材および労力を低減することができる高濃度・高密度培養においてCH296による刺激により、明らかにLAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・

培養することが可能であることが明らかとなった。

【0281】

実施例43 低血清培地（AIM-V）を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（血清濃度0%、0.15%、5%→0.1%）

LAK細胞培養において1回に30mLを採血すると、大体15mLの血漿が得られる。これを最終10Lまでの培地により培養することを考慮すると、血漿濃度として0.15%となる。また、5%の血漿濃度から培養を開始すると4日目以降、細胞を継代、希釈するときの培地における血漿濃度は0.1%程度となる。以上を鑑みてLAK細胞培養系における血清濃度の影響を確認した。

培養開始時にヒトAB型血清が0%、0.15%あるいは5%それぞれ含まれる区分を設定した。各濃度のヒトAB型血清を含むAIM-Vに 0.33×10^6 cells/m¹となるように実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例41-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびCH296固定化プレートに3mL/ウェルずつまき、終濃度1000U/m¹となるようにIL-2を添加した。これらのプレートを5%CO₂中37℃で培養した（培養0日目）。

培養開始後4日目に0%、0.15%ヒトAB型血清を含むAIM-Vで培養した区分は、最大 0.05×10^6 cells/m¹となるように、それぞれ0%あるいは0.15%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し、何も固定化していない12.5cm²細胞培養フラスコに培養液を移した（液量2.5mL）。5%ヒトAB型血清を含むAIM-Vで培養した区分は、 0.05×10^6 cells/m¹となるように0.1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量6mL）、何も固定化していない12.5cm²細胞培養フラスコに移した。各区分において終濃度500U/m¹となるようIL-2を添加した。

培養開始7日目には0%、0.15%ヒトAB型血清を含むAIM-Vで培養した区分はそれぞれ同濃度の血清を含むAIM-Vにより 0.11×10^6 cells/m¹となるように希釈し、何も固定化していない新しい25cm²細胞培養フラスコを立てたものに移した（液量最大12.6mL）。5%ヒトAB型血清を含むAIM-Vで培養した区分は、0.1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより 0.11×10^6 cells/m¹となるように希釈し、何も固定化していない新しい25cm²細胞培養フラスコを立てたものに移した（液量最大12.6mL）。各区分において終濃度500U/m¹となるようIL-2を添加した。

培養開始10日目には0%、0.15%ヒトAB型血清を含むAIM-Vで培養した区分はそれぞれ同濃度の血清を含むAIM-Vにより 0.22×10^6 cells/m¹となるように希釈し、何も固定化していない新しい25cm²細胞培養フラスコを立てたものに移した（液量最大12.6mL）。5%ヒトAB型血清を含むAIM-Vで培養した区分は、0.1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより 0.6×10^6 cells/m¹となるように希釈し、何も固定化していない新しい25cm²細胞培養フラスコを立てたものに移した（液量最大12.6mL）。各区分において終濃度500U/m¹となるようIL-2を添加した。

培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。各実験は2連で行った。その平均の各結果を表43に示す。

【0282】

【表43】

表43

血清濃度・培地	培養開始0日目刺激	拡大培養率(倍率)
0%AIM-V	抗CD3	25
	抗CD3+CH296	322
0.15%AIM-V	抗CD3	42
	抗CD3+CH296	197
5%→0.1%AIM-V	抗CD3	175
	抗CD3+CH296	353

【0283】

表43に示されるように、各血清濃度を含んだAIM-V培地を用いてのLAK細胞培養において、いずれの血清濃度区分においても、対照群（抗CD3抗体のみによる刺激）と比較してCH296および抗CD3抗体により刺激した群において高い拡大培養率が得られた。すなわち、30mL採血を想定した血清濃度におけるLAK細胞培養において、CH296および抗CD3抗体により刺激することで、明らかに高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することができた。また、このときの培養における細胞は高濃度・高密度であり、CH296で刺激することにより、このような条件下においても、明らかに高い拡大培養率であり、CH296の有効性が認められた。

【0284】

実施例44 低血清培地（AIM-V）を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（血清濃度3%→1%→0%→0%、3%→1%→0.1%→0%、3%→0.5%→0.2%→0.2%（最終培養液量約半量）、3%→0.5%→0.2%→0.05%）

実施例43と同様の観点で30mL採血を想定し得られる血清濃度を考慮してLAK細胞培養系における血清濃度の影響を確認した。

ヒトAB型血清濃度は培養開始時は3%で、培養4日目に1%あるいは0.5%ヒトAB型血清を含むAIM-V培地で細胞を希釈する群、培養7日目に0%、0.1%あるいは0.2%ヒトAB型血清を含むAIM-V培地で細胞を希釈する群、培養10日目に0%、0.05%あるいは0.2%ヒトAB型血清を含むAIM-V培地で細胞を希釈する群をそれぞれ設定した。下記表44-1に上記パターンを示す。

【0285】

【表44-1】

表44-1

	培養開始4日目	培養開始7日目	培養開始10日目
血清濃度パターン1	1%	0%	0%
血清濃度パターン2	1%	0.1%	0%
血清濃度パターン3	0.5%	0.2%	0.2%
血清濃度パターン4	0.5%	0.2%	0.05%

*細胞培養液を希釈する培地に含まれるヒトAB型血清濃度を示す

【0286】

3%のヒトAB型血清を含むAIM-Vに 0.33×10^6 cells/mLとなるように実施例1-（1）で調製したPBMCを懸濁後、実施例41-（1）で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびCH296固定化プレートに3mL/ウェルずつまき、終濃度1000U/mLとなるようにIL-2を添加した。これらのプレートを5%CO₂中37℃で培養した（培養0日目）。

培養開始後4日目に血清濃度パターン1および2で培養する区分は、 0.05×10^6 cells/mLとなるように1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量6mL）、何も固定化していない12.5cm²細胞培養フラスコに移した。血清濃度パ

ターン3および4で培養する区分は、 0.058×10^6 cells/m¹となるように0.5%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し(液量6mL)、何も固定化していない12.5cm²細胞培養フラスコに移した。各区分において終濃度500U/m¹となるようIL-2を添加した。

培養開始7日目には血清濃度パターン1で培養する区分は、 0.28×10^6 cells/m¹となるようにヒトAB型血清を含まないAIM-Vにより希釈し(液量12.6mL)、また血清濃度パターン2で培養する区分は、 0.28×10^6 cells/m¹となるように0.1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し(液量12.6mL)、何も固定化していない新しい25cm²細胞培養フラスコを立てたものにそれぞれ移した。血清濃度パターン3および4で培養する区分は、 0.48×10^6 cells/m¹となるように0.2%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し(液量12.6mL)、何も固定化していない新しい25cm²細胞培養フラスコを立てたものに移した。各区分において終濃度500U/m¹となるようIL-2を添加した。

培養開始10日目には血清濃度パターン1および2で培養する区分は、 0.51×10^6 cells/m¹となるようにヒトAB型血清を含まないAIM-Vにより希釈し(液量12.6mL)、何も固定化していない新しい25cm²細胞培養フラスコを立てたものに移した。血清濃度パターン3で培養する区分は、 0.839×10^6 cells/m¹となるように0.2%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し(液量12.6mL)、また血清濃度パターン4で培養する区分は、 0.43×10^6 cells/m¹となるように0.05%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し(液量12.6mL)、何も固定化していない新しい25cm²細胞培養フラスコを立てたものにそれぞれ移した。各区分において終濃度500U/m¹となるようIL-2を添加した。

培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。各実験は2連で行った。その平均の各結果を表44-2に示す。

【0287】

【表44-3】

表44-2

	培養開始0日目刺激	拡大培養率(倍率)
血清濃度パターン1	抗CD3	1.82
	抗CD3+CH296	4.25
血清濃度パターン2	抗CD3	1.95
	抗CD3+CH296	4.30
血清濃度パターン3(最終培養液量半量)	抗CD3	1.01
	抗CD3+CH296	2.42
血清濃度パターン4	抗CD3	1.90
	抗CD3+CH296	4.16

【0288】

表44-2に示されるように、各血清濃度を含んだAIM-V培地を用いてのLAK細胞培養において、いずれの血清濃度区分においても、対照群(抗CD3抗体のみによる刺激)と比較してCH296および抗CD3抗体により刺激した群において高い拡大培養率が得られた。すなわち、30mL採血を想定した血清濃度におけるLAK細胞培養において、CH296および抗CD3抗体により刺激することで、抗CD3抗体単独で刺激するよりも、明らかに高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することができた。また、このときの培養における細胞は高濃度・高密度であり、CH296で刺激することにより、このような条件下においても、明らかに高い拡大培養率であり、CH296の有効性が認められた。

【0289】

実施例45 低血清培地(AIM-V)を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の
出証特2004-3085985

測定（細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせた培養）

【0290】

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例36-(2)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。結果を表45に示す。

【0291】

【表45】

表45

血清濃度・培地	抗 CD3±CH296 刺激期間	培養日数	フィブロネクチン フラグメント	拡大培養率 (倍率)
1%AIM-V	4日間	15日間	対照(FNfr非固定化)	×327
1%AIM-V	4日間	15日間	CH-296	×566
1%AIM-V	6日間	15日間	対照(FNfr非固定化)	×371
1%AIM-V	6日間	15日間	CH-296	×425

【0292】

表45に示されるように、低濃度(1%)の血清を含んだ培地(AIM-V)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0293】

実施例46 新鮮分離PBMCおよび自己血漿含有培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定(0.5%自己血漿を含むAIM-V培地・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

(1) PBMCの分離および保存

インフォームド・コンセントの得られたヒト健常人ドナーより採血用注射筒にて30ml採血を実施後、採血液を500×g 20分間遠心し、自己血漿およびバフィーコート層を回収した。回収したバフィーコート層はPBSで希釈後Ficoll-paque(ファルマシア社製)上に重層して500×gで20分間遠心分離した。中間層の末梢血单核細胞(PBMC)をピペットで回収、洗浄した。採取した新鮮分離PBMCはトリパンブルー染色法にて生細胞数を算出して各実験に供した。

回収した自己血漿は56℃30分非働化後、800×gで30分間遠心分離し、その上清を非働化自己血漿として使用した(以下自己血漿と略す)。

【0294】

(2) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材(25cm²細胞培養用フラスコ)に実施例35-(1)と同様に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを除去後、各フラスコをPBSで2回、AIM-V培地で1回洗浄し各実験に供した。

【0295】

(3) LAK細胞の誘導および培養

0.5%自己血漿を含むAIM-V(以下0.5%自己血漿AIM-Vと略す)に1×10⁶cells/mlとなるように実施例46-(1)で調製した新鮮分離PBMCを懸濁後、実施例46-(2)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコに3ml/フラスコずつ細胞懸濁液を入れ、終濃度1000U/mlとなるようにIL-2を添加した。これらのフラスコを5%CO₂

中37℃で培養した（培養0日目）。培養開始後1日目には1000U/m1のIL-2を含む0.5%自己血漿AIM-Vを7ml/フラスコずつ添加した。培養開始後4日目には培養液を何も固定化していない85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグ（オプティサイトバッグまたはX-Foldバッグ バクスター社製）に移した後、0.5%自己血漿AIM-Vを20ml/バッグずつ添加し、終濃度500U/m1となるようIL-2を添加した。培養開始6日目には0.5%自己血漿/AIM-Vを30ml/バッグずつ添加し、終濃度500U/m1となるようIL-2を添加した。培養開始8日目には培養液の一部を適宜希釀した後、何も固定化していない85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグ（オプティサイトバッグまたはX-Foldバッグ）に移し、終濃度500U/m1となるようIL-2を添加した。培養開始11、13日目には終濃度500U/m1となるようIL-2を添加した。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表46に示す。

【0296】

【表46】

表46

血漿濃度・培地・細胞培養用 CO ₂ ガス透過性バッグ	P B M C ドナー	培養日数	フィプロネクチン フラグメント	拡大培養率 (倍率)
0.5%自己血漿AIM-V オプティサイトバッグ	A	15日間	対照 (FNfr非固定化)	×22
0.5%自己血漿AIM-V オプティサイトバッグ	A	15日間	CH-296	×259
0.5%自己血漿AIM-V-X -Foldバッグ	A	15日間	CH-296	×360
0.5%自己血漿AIM-V オプティサイトバッグ	B	15日間	対照 (FNfr非固定化)	×34
0.5%自己血漿AIM-V オプティサイトバッグ	B	15日間	CH-296	×432
0.5%自己血漿AIM-V-X -Foldバッグ	B	15日間	CH-296	×360

【0297】

表46に示されるように、低濃度(0.5%)の自己血漿を含んだ培地(AIM-V)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、細胞培養用CO₂ガス透過性バッグの種類によらずLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィプロネクチンフラグメントは低濃度の血漿を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0298】

実施例47 新鮮分離P BMCおよび自己血漿含有培地を用いたLAK細胞集団におけるCD8陽性細胞比率の測定(0.5%自己血漿を含むAIM-V培地・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

【0299】

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例46-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。培養開始15日目に実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表47に示す。

【0300】

【表47】

表47	血漿濃度・培地・細胞培養用 CO ₂ ガス透過性バッグ	P B M C	培養日数	フィプロネクチン フラグメント	CD8 細胞陽性 比率 (%)
	0.5%自己血漿A I M-V・ オプティサイトバッグ	B	15日間	対照 (FNfr非固定化)	45.0
	0.5%自己血漿A I M-V・ オプティサイトバッグ	B	15日間	CH-296	89.8
	0.5%自己血漿A I M-V・ K-Foldバッグ	B	15日間	CH-296	90.0

【0301】

表47に示されるように、低濃度(0.5%)の自己血漿を含んだ培地(A I M-V)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、細胞培養用CO₂ガス透過性バッグの種類によらずLAK細胞集団中のCD8細胞陽性比率が高い。このことから各フィプロネクチンフラグメントは低濃度の血漿を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0302】

実施例48 新鮮分離P B M Cおよび自己血漿含有培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定(0.5%自己血漿を含むA I M-V培地・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

(1) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材(25cm²細胞培養用フラスコ)に実施例35-(1)と同様に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを除去後、各フラスコをPBSで2回、A I M-V培地で1回洗浄し各実験に供した。

【0303】

(2) LAK細胞の誘導および培養

0.5%自己血漿を含むA I M-V(以下0.5%自己血漿A I M-Vと略す)に1×10⁶ cells/m²となるように実施例46-(1)と同様の方法で調製した新鮮分離P B M Cを懸濁後、実施例48-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコに3m²/フラスコずつ細胞懸濁液を入れ、終濃度1000U/m²となるようにIL-2を添加した。これらのフラスコを5%CO₂中37℃で培養した(培養0日目)。培養開始後1日目には1000U/m²のIL-2を含む0.5%自己血漿A I M-Vを7m²/フラスコずつ添加した。培養開始後4日目には培養液を何も固定化していない85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグ(オプティサイトバッグ)に移した後、0.5%自己血漿A I M-Vを20m²/バッグずつ添加し、終濃度500U/m²となるようIL-2を添加した。培養開始6日目には0.5%自己血漿/A I M-Vを30m²/バッグずつ添加し、終濃度500U/m²となるようIL-2を添加した。培養開始後8日目には培養液の一部を適宜希釈した後、何も固定化していない85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグ(オプティサイトバッグ)に移し、終濃度500U/m²となるようIL-2を添加した。培養開始11日目には終濃度500U/m²となるようIL-2を添加した。また、同様に4日目まで培養した培養液を何も固定化していない180cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグに一部(10m²中7m²)移した後、0.5%自己血漿A I M-Vを58m²/バッグずつ添加し、終濃度500U/m²となるようIL-2を添加した。培養開始6日目には0.5%自己血漿/A I M-Vを65m²/バッグずつ添加し、終濃度500U/m²となるようIL-2を添加した。培養開始後8日目には培養液の一

部を適宜希釈した後、何も固定化していない 180 cm^2 細胞培養用 CO_2 ガス透過性バッグ（オプティサイトバッグ）に移し、終濃度 $500\text{ U}/\text{ml}$ となるよう IL-2 を添加した。培養開始 11、13 日目には終濃度 $500\text{ U}/\text{ml}$ となるよう IL-2 を添加した。この際培養開始 11 日目に 0.5% 自己血漿/AIM-V を 130 ml 添加する系も設定した。培養開始 15 日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表48に示す。

【0304】

【表48】

表48

血漿濃度・培地・細胞培養用 CO_2 ガス透過性バッグ	バッグ培養 面積	11 日目 培地添加	培養日数	フィブロネクチン フラグメント	拡大培養率 (倍率)
0.5% 自己血漿 AIM-V オプティサイトバッグ	85 cm^2	なし	15 日間	対照 (FNfr 非 固定化)	$\times 22$
0.5% 自己血漿 AIM-V オプティサイトバッグ	85 cm^2	なし	15 日間	CH-296	$\times 259$
0.5% 自己血漿 AIM-V オプティサイトバッグ	180 cm^2	なし	15 日間	CH-296	$\times 473$
0.5% 自己血漿 AIM-V オプティサイトバッグ	180 cm^2	あり	15 日間	CH-296	$\times 911$

【0305】

表48に示されるように、低濃度(0.5%)の自己血漿を含んだ培地(AIM-V)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用 CO_2 ガス透過性バッグを組み合わせた LAK 細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、細胞培養用 CO_2 ガス透過性バッグの培養面積・培養方法・最終培地量によらず LAK 細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血漿を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用 CO_2 ガス透過性バッグを組み合わせた LAK 細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0306】

実施例49 新鮮分離 PBMC および自己血漿含有培地を用いた LAK 細胞集団中における CD8 陽性細胞比率の測定(0.5% 自己血漿を含む AIM-V 培地・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用 CO_2 ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例48-(2)と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。培養開始 15 日目に実施例48-(2)と同様の方法で CD8 陽性細胞の含有率を測定した。結果を表49に示す。

【0307】

【表49】

表49

血漿濃度・培地・細胞培養用 CO ₂ ガス透過性バッグ	バッグ培養 面積	11日目 培地添加	培養日数	フィプロネクチンフ ラグメント	CD8細胞含有 比率(%)
0.5%自己血漿A IM-V・ オプティサイトバッグ	85cm ²	なし	15日間	対照(FNfr非固 定化)	37.4
0.5%自己血漿A IM-V・ オプティサイトバッグ	85cm ²	なし	15日間	CH-296	70.0
0.5%自己血漿A IM-V・ オプティサイトバッグ	180cm ²	なし	15日間	CH-296	56.2
0.5%自己血漿A IM-V・ オプティサイトバッグ	180cm ²	あり	15日間	CH-296	58.4

【0308】

表49に示されるように、低濃度(0.5%)の自己血漿を含んだ培地(AIM-V)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、細胞培養用CO₂ガス透過性バッグの培養面積・培養方法・最終培地量によらずLAK細胞集団中のCD8細胞陽性比率が高い。このことから各フィプロネクチンフラグメントは低濃度の血漿清を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0309】

実施例50 新鮮分離PBMCおよび自己血漿含有培地を用いたLAK細胞培養培養系における細胞傷害活性の測定(0.5%自己血漿を含むAIM-V培地・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例46-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

【0310】

(2) 培養したLAK細胞の細胞傷害活性の測定

実施例25-(2)と同様の方法で培養後15日目のLAKの細胞傷害活性を測定した。結果を表50に示す。

【0311】

【表50】

表50

血漿濃度・培地・細胞培養用CO ₂ ガス透過性バッグ	培養日数	フィプロネクチン フラグメント	E/T	細胞傷害活性 (%)	細胞傷害活性 (%)
				標的細胞K562	標的細胞Daudi
0.5%自己血漿A IM-V・オ プティサイトバッグ	15日間	対照(FNfr非 固定化)	90 30 10	50.9 32.9 16.9	56.2 49.6 35.7
0.5%自己血漿A IM-V・オ プティサイトバッグ	15日間	CH-296	90 30 10	75.9 48.3 19.6	62.3 53.7 40.2

【0312】

表50に示されるように、低濃度(0.5%)の自己血漿を含んだ培地(AIM-V)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の細胞傷害活性が高い。このこと

から各フィプロネクチンフラグメントは低濃度の血漿を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0313】

実施例51 新鮮分離PBMCおよび自己血漿含有培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定(0.5%自己血漿を含むAIM-V培地・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

(1) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材(25cm²細胞培養用フラスコ)に実施例35-(1)と同様に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを除去後、各フラスコをPBSで2回、AIM-V培地で1回洗浄し各実験に供した。

【0314】

(2) LAK細胞の誘導および培養

0.5%自己血漿を含むAIM-V(以下0.5%自己血漿AIM-Vと略す)に5×10⁵cells/mlとなるように(ただし、生細胞数の計測はチュルク液(関東化学社製)で実施した。)実施例46-(1)と同様の方法で調製した新鮮分離PBMCを懸濁後、実施例51-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコに3ml/フラスコずつ細胞懸濁液を入れ、終濃度1000U/mlとなるようにIL-2を添加した。これらのフラスコを5%CO₂中37℃で培養した(培養0日目)。培養開始後1日目には1000U/mlのIL-2を含む0.5%自己血漿AIM-Vを7ml/フラスコずつ添加した。培養開始後4日目には培養液を何も固定化していない180cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグに一部(10ml中7ml)移した後、0.5%自己血漿AIM-Vを5.8ml/バッグずつ添加し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始6日目には0.5%自己血漿/AIM-Vを6.5ml/バッグずつ添加し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始後8日目には培養液の一部を適宜希釈した後、何も固定化していない180cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグ(オプティサイトバッグ)に移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始11、13日目には終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。この際培養開始11日目に自己血漿を含まないAIM-Vまたは0.5%自己血漿/AIM-Vを130ml添加する系も設定した。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表51に示す。

【0315】

【表51】

表51

血漿濃度・培地・細胞培養用 CO ₂ ガス透過性バッグ	PBMC ドナー	11日目 培地添加	11日目添加 培地	フィブロネクチン フラグメント	拡大培養率 (倍率)
0.5%自己血漿AIM-V・ オプティサイトバッグ	C	なし	なし	対照 (FNfr非 固定化)	×570
		なし	なし	CH-296	×1034
		あり	0.5%自己血漿 AIM-V	CH-296	×1857
		あり	0%自己血漿 AIM-V	CH-296	×1882
0.5%自己血漿AIM-V・ オプティサイトバッグ	D	なし	なし	対照 (FNfr非 固定化)	×947
		なし	なし	CH-296	×1213
		あり	0.5%自己血漿 AIM-V	CH-296	×1647
		あり	0%自己血漿 AIM-V	CH-296	×1832
0.5%自己血漿AIM-V・ オプティサイトバッグ	E	なし	なし	対照 (FNfr非 固定化)	×743
		なし	なし	CH-296	×931
		あり	0.5%自己血漿 AIM-V	CH-296	×1960
		あり	0%自己血漿 AIM-V	CH-296	×1747

【0316】

表51に示されるように、低濃度(0.5%)の自己血漿を含んだ培地(AIM-V)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、細胞培養用CO₂ガス透過性バッグの培養面積・培養方法・最終培地量によらずLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血漿を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0317】

実施例52 新鮮分離PBMCおよび自己血漿含有培地を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞比率測定(0.5%自己血漿を含むAIM-V培地・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例51-(2)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。培養開始15日目に実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表52に示す。

【0318】

【表52】

表52

血漿濃度・培地・細胞培養用 CO ₂ ガス透過性バッグ	PBMC ドナー	11日目培 地添加	11日目添加 培地	フィプロネクチン フラグメント	CD8陽性細 胞率 (%)
0.5%自己血漿AIM-V・ オプティサイトバッグ	C	なし	なし	対照 (FNfr非 固定化)	59.1
		なし	なし	CH-296	80.8
		あり	0.5%自己血漿 AIM-V	CH-296	83.3
		あり	0%自己血漿 AIM-V	CH-296	83.6
0.5%自己血漿AIM-V・ オプティサイトバッグ	D	なし	なし	対照 (FNfr非 固定化)	77.2
		なし	なし	CH-296	83.4
		あり	0.5%自己血漿 AIM-V	CH-296	84.0
		あり	0%自己血漿 AIM-V	CH-296	85.9
0.5%自己血漿AIM-V・ オプティサイトバッグ	E	なし	なし	対照 (FNfr非 固定化)	72.6
		なし	なし	CH-296	84.6
		あり	0.5%自己血漿 AIM-V	CH-296	86.8
		あり	0%自己血漿 AIM-V	CH-296	89.4

【0319】

表52に示されるように、低濃度(0.5%)の自己血漿を含んだ培地(AIM-V)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、細胞培養用CO₂ガス透過性バッグの培養面積・培養方法・最終培地量によらずLAK細胞集団中のCD8陽性細胞比率が高い。このことから各フィプロネクチンフラグメントは低濃度の血漿を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0320】

実施例53 低血清培地(AIM-V)を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2レセプター(IL-2R)発現の誘導

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を1%HumanAB血清を含むAIM-V培地に変更した。

【0321】

(2) LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例3-(2)と同様の方法で、IL-2R発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表53に示す。かかる表ではIL-2R発現陽性細胞含有率(%)をIL-2R発現率(%)と表示する。

【0322】

【表53】

表53

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	I L - 2 R 発現率 (%)
1%AIM-V	対照 (FNfr 非固定化)	23.5
1%AIM-V	CH-296	27.2

【0323】

表53に示されるように、低濃度の血清を含んだAIM-V培地を用いてのLAK細胞誘導初期各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【0324】

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法によれば、無血清・低血清濃度培地を用いた場合でも、拡大培養率が高く、細胞傷害活性が高く維持され、IL-2Rの発現量が有意に上昇し、CD8陽性細胞の比率が向上した細胞傷害性リンパ球が得られる。当該リンパ球は、例えば、養子免疫療法に好適に使用される。従って、本発明の方法は、医療分野への多大な貢献が期待される。

【図面の簡単な説明】

【0325】

【図1】フィブロネクチンのドメイン構造を示す模式図である。

【配列表フリーテキスト】

【0326】

SEQ ID NO:1 ; Partial region of fibronectin named III-8.
 SEQ ID NO:2 ; Partial region of fibronectin named III-9.
 SEQ ID NO:3 ; Partial region of fibronectin named III-10.
 SEQ ID NO:4 ; Partial region of fibronectin named III-12.
 SEQ ID NO:5 ; Partial region of fibronectin named III-13.
 SEQ ID NO:6 ; Partial region of fibronectin named III-14.
 SEQ ID NO:7 ; Partial region of fibronectin named CS-1.
 SEQ ID NO:8 ; Fibronectin fragment named C-274.
 SEQ ID NO:9 ; Fibronectin fragment named H-271.
 SEQ ID NO:10 ; Fibronectin fragment named H-296.
 SEQ ID NO:11 ; Fibronectin fragment named CH-271.
 SEQ ID NO:12 ; Fibronectin fragment named CH-296.
 SEQ ID NO:13 ; Fibronectin fragment named C-CS1.
 SEQ ID NO:14 ; Fibronectin fragment named CHV-89.
 SEQ ID NO:15 ; Fibronectin fragment named CHV-90.
 SEQ ID NO:16 ; Fibronectin fragment named CHV-92.
 SEQ ID NO:17 ; Fibronectin fragment named CHV-179.
 SEQ ID NO:18 ; Fibronectin fragment named CHV-181.
 SEQ ID NO:19 ; Fibronectin fragment named H-275-Cys.
 SEQ ID NO:20 ; Primer 12S.
 SEQ ID NO:21 ; Primer 14A.
 SEQ ID NO:22 ; Primer Cys-A.
 SEQ ID NO:23 ; Primer Cys-S.

【配列表】
SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA BIO INC.

<120> Process for the preparation of lymphocyte having cytotoxic activity

<130> T-1903

<160> 23

<210> 1

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-8

<400> 1

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1													15	
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
													30	
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
													45	
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
													60	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
													75	
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr			
					80				85					

<210> 2

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-9

<400> 2

Gly	Leu	Asp	Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala
1													15	
Asn	Ser	Phe	Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr
													30	
Gly	Tyr	Arg	Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro
													45	
Arg	Glu	Asp	Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr
													60	
					50			55						

Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu
 65 70 75
 Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr
 80 85 90

<210> 3

<211> 94

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-10

<400> 3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg
 20 25 30
 Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
 35 40 45
 Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser
 50 55 60
 Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val
 65 70 75
 Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile
 80 85 90

Asn Tyr Arg Thr

<210> 4

<211> 92

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-12

<400> 4

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr
 20 25 30
 Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met
 35 40 45
 Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Val Val Val Ser
 50 55 60
 Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu
 65 70 75
 Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr
 80 85 90

Leu Glu

<210> 5

<211> 89

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-13

<400> 5

Asn	Val	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Arg	Val	Thr	Asp	Ala	Thr	Glu
1									10					15
Thr	Thr	Ile	Thr	Ile	Ser	Trp	Arg	Thr	Lys	Thr	Glu	Thr	Ile	Thr
									25					30
Gly	Phe	Gln	Val	Asp	Ala	Val	Pro	Ala	Asn	Gly	Gln	Thr	Pro	Ile
									40					45
Gln	Arg	Thr	Ile	Lys	Pro	Asp	Val	Arg	Ser	Tyr	Thr	Ile	Thr	Gly
									55					60
Leu	Gln	Pro	Gly	Thr	Asp	Tyr	Lys	Ile	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Leu	Asn
								65	70					75
Asp	Asn	Ala	Arg	Ser	Ser	Pro	Val	Val	Ile	Asp	Ala	Ser	Thr	
								80	85					

<210> 6

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-14

<400> 6

Ala	Ile	Asp	Ala	Pro	Ser	Asn	Leu	Arg	Phe	Leu	Ala	Thr	Thr	Pro
1									10					15
Asn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Trp	Gln	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	Ile	Thr
									25					30
Gly	Tyr	Ile	Ile	Lys	Tyr	Glu	Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Glu
									40					45
Val	Val	Pro	Arg	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Thr	Glu	Ala	Thr	Ile	Thr
								50	55					60
Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Thr	Ile	Tyr	Val	Ile	Ala	Leu
								65	70					75
Lys	Asn	Asn	Gln	Lys	Ser	Glu	Pro	Leu	Ile	Gly	Arg	Lys	Lys	Thr
								80	85					90

<210> 7

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named CS-1

<400> 7

Asp	Glu	Leu	Pro	Gln	Leu	Val	Thr	Leu	Pro	His	Pro	Asn	Leu	His
1														15
Gly	Pro	Glu	Ile	Leu	Asp	Val	Pro	Ser	Thr					
														25

<210> 8

<211> 274

<212> PRT

<213> Human

<220>

<223> fibronectin fragment named C-274

<400> 8

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1														15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
														30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
														45
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
														60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
														75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
														90
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
														105
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
														120
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
														135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
														150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
														165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
														180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
														195
Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
														210
Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
														225

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 230 235 240
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
 245 250 255
 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
 260 265 270
 Thr Glu Ile Asp

<210> 9
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Human

<220>
 <223> fibronectin fragment named H-271

<400> 9
 Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr
 20 25 30
 Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met
 35 40 45
 Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Val Val Val Ser
 50 55 60
 Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu
 65 70 75
 Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr
 80 85 90
 Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala
 95 100 105
 Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr
 110 115 120
 Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr
 125 130 135
 Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile
 140 145 150
 Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr
 155 160 165
 Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser
 170 175 180
 Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr
 185 190 195
 Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile
 200 205 210
 Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg
 215 220 225
 Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile
 230 235 240

Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala
 245 250 255
 Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys
 260 265 270
 Thr

<210> 10

<211> 296

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named H-296

<400> 10

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr
 20 25 30
 Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met
 35 40 45
 Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Val Val Val Ser
 50 55 60
 Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu
 65 70 75
 Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr
 80 85 90
 Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala
 95 100 105
 Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr
 110 115 120
 Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr
 125 130 135
 Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile
 140 145 150
 Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr
 155 160 165
 Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser
 170 175 180
 Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr
 185 190 195
 Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile
 200 205 210
 Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg
 215 220 225
 Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile
 230 235 240
 Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala
 245 250 255

Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys
 260 265 270
 Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu
 275 280 285
 His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr
 290 295

<210> 11

<211> 549

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CH-271

<400> 11

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
 1 5 10 15
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20 25 30
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Val Tyr Glu Gln
 65 70 75
 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
 80 85 90
 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
 95 100 105
 Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
 110 115 120
 Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
 125 130 135
 Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
 140 145 150
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg
 155 160 165
 Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
 170 175 180
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
 185 190 195
 Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
 200 205 210
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 215 220 225
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 230 235 240
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg

245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr		Arg
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr		Asp
275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln		Trp
290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val		Thr
305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala		Pro
320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr		Lys
335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser		Arg
350	355	360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro		Pro
365	370	375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr		Ile
380	385	390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val		Asp
395	400	405
Ala Val Pro Ala Asn Gln Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile		Lys
410	415	420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly		Thr
425	430	435
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg		Ser
440	445	450
Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro		Ser
455	460	465
Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val		Ser
470	475	480
Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys		Tyr
485	490	495
Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro		Arg
500	505	510
Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly		Thr
515	520	525
Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys		Ser
530	535	540
Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr		
545		

<210> 12

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CH-296

<400> 12

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
 1 5 10 15
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20 25 30
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
 65 70 75
 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
 80 85 90
 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
 95 100 105
 Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
 110 115 120
 Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
 125 130 135
 Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
 140 145 150
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg
 155 160 165
 Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
 170 175 180
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
 185 190 195
 Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
 200 205 210
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 215 220 225
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 230 235 240
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
 245 250 255
 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
 260 265 270
 Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp
 275 280 285
 Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp
 290 295 300
 Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr
 305 310 315
 Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro
 320 325 330
 Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys
 335 340 345
 Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg
 350 355 360

Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro
 365 370 375
 Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile
 380 385 390
 Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp
 395 400 405
 Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys
 410 415 420
 Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr
 425 430 435
 Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser
 440 445 450
 Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser
 455 460 465
 Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser
 470 475 480
 Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr
 485 490 495
 Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg
 500 505 510
 Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr
 515 520 525
 Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser
 530 535 540
 Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu
 545 550 555
 Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp
 560 565 570
 Val Pro Ser Thr

<210> 13

<211> 302

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named C-CS1

<400> 13

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
 1 5 10 15
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20 25 30
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
 65 70 75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
 80 85 90
 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
 95 100 105
 Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
 110 115 120
 Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
 125 130 135
 Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
 140 145 150
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg
 155 160 165
 Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
 170 175 180
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
 185 190 195
 Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
 200 205 210
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 215 220 225
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 230 235 240
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
 245 250 255
 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
 260 265 270
 Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr
 275 280 285
 Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro
 290 295 300
 Ser Thr

<210> 14

<211> 367

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-89

<400> 14

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
 1 5 10 15
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20 25 30
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
 65 70 75
 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
 80 85 90
 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
 95 100 105
 Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
 110 115 120
 Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
 125 130 135
 Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
 140 145 150
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg
 155 160 165
 Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
 170 175 180
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
 185 190 195
 Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
 200 205 210
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 215 220 225
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 230 235 240
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
 245 250 255
 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
 260 265 270
 Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg
 275 280 285
 Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp
 290 295 300
 Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val
 305 310 315
 Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp
 320 325 330
 Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr
 335 340 345
 Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro
 350 355 360
 Val Val Ile Asp Ala Ser Thr
 365

<210> 15

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-90

<400> 15

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1			5			10							15	
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
	20						25						30	
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
	35						40						45	
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
	50						55						60	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
	65						70						75	
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
	80						85						90	
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
	95						100						105	
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
	110						115						120	
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
	125						130						135	
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
	140						145						150	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
	155						160						165	
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
	170						175						180	
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
	185						190						195	
Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
	200						205						210	
Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
	215						220						225	
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys
	230						235						240	
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
	245						250						255	
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg
	260						265						270	
Thr	Glu	Ile	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Ala	Ile	Asp	Ala	Pro	Ser	Asn
	275						280						285	
Leu	Arg	Phe	Leu	Ala	Thr	Thr	Pro	Asn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Trp
	290						295						300	
Gln	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	Ile	Thr	Gly	Tyr	Ile	Ile	Lys	Tyr	Glu
	305						310						315	
Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Glu	Val	Val	Pro	Arg	Pro	Arg	Pro
	320						325						330	
Gly	Val	Thr	Glu	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Thr	Glu
	335						340						345	
Tyr	Thr	Ile	Tyr	Val	Ile	Ala	Leu	Lys	Asn	Asn	Gln	Lys	Ser	Glu

350	355	360
Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr		
365		

<210> 16

<211> 370

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-92

<400> 16

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg			
1	5	10	15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu			
20	25		30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu			
35	40		45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu			
50	55		60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln			
65	70		75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp			
80	85		90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe			
95	100		105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg			
110	115		120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp			
125	130		135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr			
140	145		150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg			
155	160		165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp			
170	175		180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu			
185	190		195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg			
200	205		210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe			
215	220		225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys			
230	235		240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg			
245	250		255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg			
260	265		270

Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp
 275 280 285
 Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp
 290 295 300
 Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr
 305 310 315
 Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro
 320 325 330
 Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys
 335 340 345
 Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg
 350 355 360
 Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu
 365 370

<210> 17

<211> 457

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-179

<400> 17

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
 1 5 10 15
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20 25 30
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
 65 70 75
 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
 80 85 90
 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
 95 100 105
 Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
 110 115 120
 Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
 125 130 135
 Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
 140 145 150
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg
 155 160 165
 Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
 170 175 180
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu

185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val	Thr Val Arg Tyr Tyr Arg	
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg		
275	280	285
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp		
290	295	300
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val		
305	310	315
Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp		
320	325	330
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr		
335	340	345
Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro		
350	355	360
Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu		
365	370	375
Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln		
380	385	390
Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys		
395	400	405
Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly		
410	415	420
Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr		
425	430	435
Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro		
440	445	450
Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr		
455		

<210> 18

<211> 459

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-181

<400> 18

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1

5

10

15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20 25 30
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Val Tyr Glu Gln
 65 70 75
 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
 80 85 90
 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
 95 100 105
 Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
 110 115 120
 Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
 125 130 135
 Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
 140 145 150
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg
 155 160 165
 Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
 170 175 180
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
 185 190 195
 Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
 200 205 210
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 215 220 225
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 230 235 240
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
 245 250 255
 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
 260 265 270
 Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp
 275 280 285
 Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp
 290 295 300
 Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr
 305 310 315
 Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro
 320 325 330
 Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys
 335 340 345
 Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg
 350 355 360
 Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro
 365 370 375
 Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile
 380 385 390

Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp
 395 400 405
 Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys
 410 415 420
 Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr
 425 430 435
 Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser
 440 445 450
 Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr
 455

<210> 19

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named H-275-Cys

<400> 19

Met Ala Ala Ser Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr
 1 5 10 15
 Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn
 20 25 30
 Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys
 35 40 45
 Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser
 50 55 60
 Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser
 65 70 75
 Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly
 80 85 90
 Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg
 95 100 105
 Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr
 110 115 120
 Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala
 125 130 135
 Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg
 140 145 150
 Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile
 155 160 165
 Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val
 170 175 180
 Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe
 185 190 195
 Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro
 200 205 210
 Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly

215	220	225
Ser Pro Pro Arg	Glu Val Val Pro Arg	Pro Arg Pro Gly Val
230	235	240
Glu Ala Thr Ile	Thr Gly Leu Glu Pro	Gly Thr Glu Tyr Thr
245	250	255
Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln	Lys Ser Glu Pro Leu	Ile
260	265	270
Gly Arg Lys Lys Thr Cys		
275		

<210> 20

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 12S

<400> 20

aaaccatggc agcttagcgct attcctgcac caactgac

38

<210> 21

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 14A

<400> 21

aaaggatccc taactagtct tttccttcc aatcag

36

<210> 22

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer Cys-A

<400> 22

aaaagcggcc gctagcgcaa gccatggtct gttcctgtg

40

<210> 23

<211> 41

<212> DNA

出証特 2004-3085985

<213> Artificial Sequence

<220>

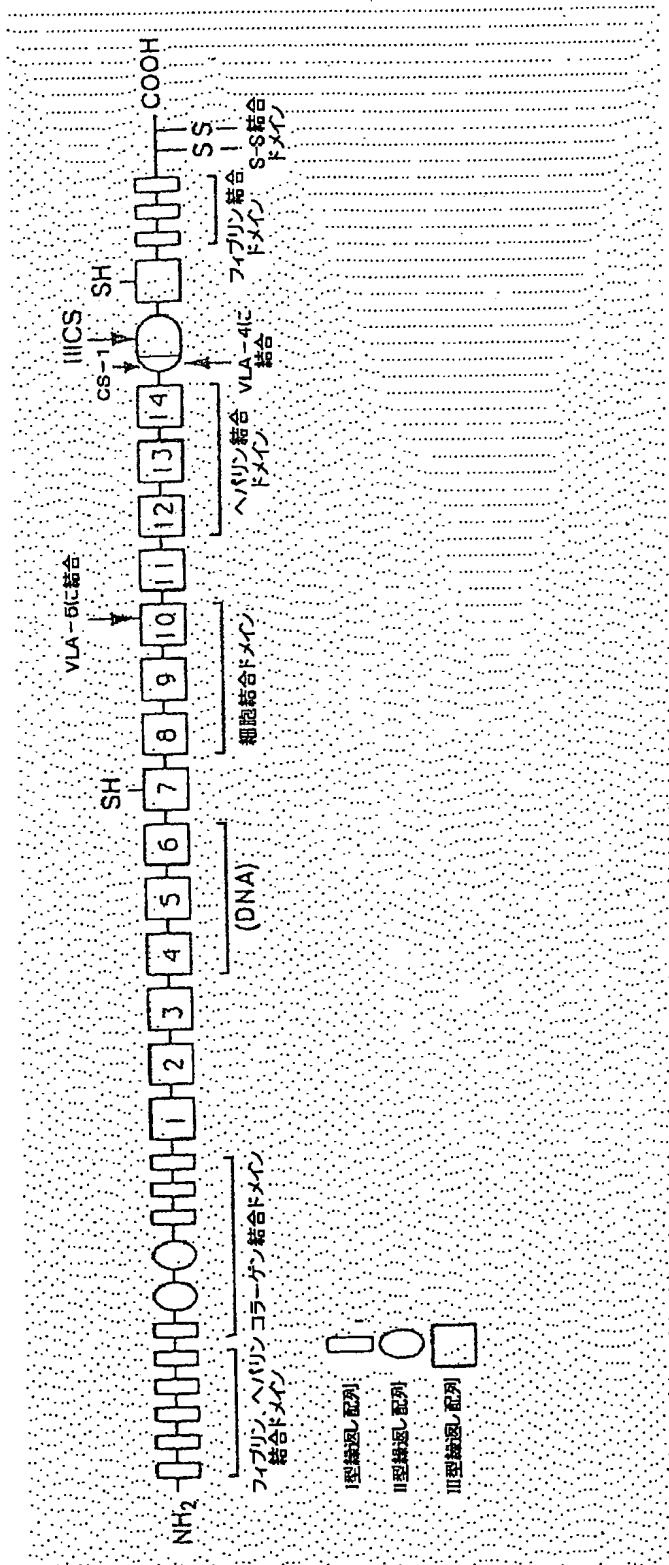
<223> primer Cys-S

<400> 23

aaaagcggcc gcactagtgc atagggatcc ggctgagcaa c

41

【書類名】 図面
 【図 1】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】

本発明の目的は、安全性が高く、医療への使用に適した、細胞傷害活性を高いレベルで保持した細胞傷害性リンパ球を取得する方法を提供することにある。

【解決手段】

血清および血漿の濃度が0～5%未満である培地を用いて、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行う工程を含むことを特徴とする、細胞傷害性リンパ球の製造方法を提供する。本発明の方法は、高い拡大培養率を有し、安全性が高く、さらに患者への負担が軽減された有用な方法である。本発明の方法によりインターロイキン-2レセプターを高発現し、CD8陽性細胞を高比率で含有し、高い細胞傷害活性を有する細胞傷害性リンパ球を得ることができる。

【選択図】 なし

特願 2004-222441

出願人履歴情報

識別番号

[302019245]

1. 変更年月日

2002年 4月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号

氏 名

タカラバイオ株式会社

SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA BIO INC.

<120> Process for the preparation of lymphocyte having cytotoxic activity

<130> 04-058-PCTJP

<150> JP 2003-298208

<151> 2003-08-22

<150> JP 2004-699

<151> 2004-01-05

<150> JP 2004-115648

<151> 2004-04-09

<150> JP 2004-222441

<151> 2004-07-29

<160> 29

<210> 1

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-8

<400> 1

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu

20 25 30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Asp Val Ala Glu Leu

35 40 45

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu

50 55 60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln

65 70 75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr

80 85

<210> 2

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-9

<400> 2

Gly	Leu	Asp	Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala
1				5				10				15		
Asn	Ser	Phe	Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr
				20				25				30		
Gly	Tyr	Arg	Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro
				35				40				45		
Arg	Glu	Asp	Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr
				50				55				60		
Asn	Leu	Thr	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu
				65				70				75		
Asn	Gly	Arg	Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr
				80				85				90		

<210> 3

<211> 94

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-10

<400> 3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro

1 5 10 15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg
20 25 30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser
50 55 60
Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val
65 70 75
Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile
80 85 90
Asn Tyr Arg Thr

<210> 4

<211> 84

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-11

<400> 4

Gln Met Gln Val Thr Asp Val Gln Asp Asn Ser Ile Ser Val Lys
1 5 10 15
Trp Leu Pro Ser Ser Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg Val Thr Thr

20 25 30
Thr Pro Lys Asn Gly Pro Gly Pro Thr Lys Thr Lys Thr Ala Gly
35 40 45
Pro Asp Gln Thr Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gln Pro Thr Val
50 55 60
Glu Tyr Val Val Ser Val Tyr Ala Gln Asn Pro Ser Gly Glu Ser
65 70 75
Gln Pro Leu Val Gln Thr Ala Val Thr
80

<210> 5

<211> 92

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-12

<400> 5

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro
1 5 10 15
Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr
20 25 30
Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met
35 40 45

Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser
50 55 60
Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu
65 70 75
Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr
80 85 90
Leu Glu

<210> 6

<211> 89

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-13

<400> 6

Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu
1 5 10 15
Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr
20 25 30
Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gln Gln Thr Pro Ile
35 40 45
Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn

65 70 75

Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr

80 85

<210> 7

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-14

<400> 7

Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro

1 5 10 15

Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr

20 25 30

Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu

35 40 45

Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr

50 55 60

Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu

65 70 75

Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr

80

85

90

<210> 8

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named CS-1

<400> 8

Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His

1

5

10

15

Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr

20

25

<210> 9

<211> 274

<212> PRT

<213> Human

<220>

<223> fibronectin fragment named C-274

<400> 9

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
20 25 30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
35 40 45

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
50 55 60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
65 70 75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
80 85 90

Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
95 100 105

Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
110 115 120

Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
125 130 135

Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
140 145 150

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg
155 160 165

Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
170 175 180

Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu

185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp		

〈210〉 10

〈211〉 271

<212> PRT

213 Human

<220>

<223> fibronectin fragment named H-271

<400> 10

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr

20 25 30
Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met
35 40 45
Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser
50 55 60
Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu
65 70 75
Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gin Gly Val Val Thr Thr
80 85 90
Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala
95 100 105
Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr
110 115 120
Ile Thr Gly Phe Gin Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gin Thr
125 130 135
Pro Ile Gin Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile
140 145 150
Thr Gly Leu Gin Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr
155 160 165
Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser
170 175 180
Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr
185 190 195
Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gin Pro Pro Arg Ala Arg Ile
200 205 210
Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg

215 220 225
Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile
230 235 240
Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala
245 250 255
Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys
260 265 270

Thr

<210> 11

<211> 296

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named H-296

<400> 11

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro
1 5 10 15
Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr
20 25 30
Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met
35 40 45
Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser

50	55	60
Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu		
65	70	75
Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr		
80	85	90
Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala		
95	100	105
Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr		
110	115	120
Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr		
125	130	135
Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile		
140	145	150
Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr		
155	160	165
Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser		
170	175	180
Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr		
185	190	195
Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile		
200	205	210
Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg		
215	220	225
Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile		
230	235	240
Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala		

245	250	255
Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys		
260	265	270
Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu		
275	280	285
His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr		
290	295	

<210> 12

<211> 549

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CH-271

<400> 12

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg			
1	5	10	15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu			
20	25		30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu			
35	40		45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu			
50	55		60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gin
65 70 75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gin Lys Thr Gly Leu Asp
80 85 90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
95 100 105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
110 115 120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
125 130 135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
140 145 150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg
155 160 165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gin Gin Ser Thr Val Ser Asp
170 175 180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
185 190 195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
200 205 210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gin Glu Phe
215 220 225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
230 235 240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
245 250 255

Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
260 265 270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp
275 280 285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp
290 295 300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr
305 310 315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro
320 325 330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys
335 340 345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg
350 355 360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro
365 370 375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile
380 385 390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp
395 400 405
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys
410 415 420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr
425 430 435
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser
440 445 450

Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser
455 460 465
Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser
470 475 480
Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr
485 490 495
Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg
500 505 510
Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr
515 520 525
Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser
530 535 540
Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
545

<210> 13

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CH-296

<400> 13

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1	5	10	15											
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
20								25					30	
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
35								40					45	
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
50								55					60	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
65								70					75	
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
80								85					90	
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
95								100					105	
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
110								115					120	
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
125								130					135	
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
140								145					150	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
155								160					165	
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
170								175					180	
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
185								190					195	
Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg

200 205 210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gin Glu Phe
215 220 225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
230 235 240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
245 250 255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
260 265 270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp
275 280 285
Leu Lys Phe Thr Gin Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gin Trp
290 295 300
Thr Pro Pro Asn Val Gin Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr
305 310 315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro
320 325 330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys
335 340 345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg
350 355 360
Pro Ala Gin Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro
365 370 375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile
380 385 390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gin Val Asp

395 400 405
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys
410 415 420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr
425 430 435
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser
440 445 450
Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser
455 460 465
Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser
470 475 480
Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr
485 490 495
Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg
500 505 510
Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr
515 520 525
Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser
530 535 540
Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu
545 550 555
Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp
560 565 570
Val Pro Ser Thr

<210> 14

<211> 302

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named C-CS1

<400> 14

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu

20 25 30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu

35 40 45

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu

50 55 60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln

65 70 75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp

80 85 90

Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe

95 100 105

Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg

110 115 120

Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp

125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr		
275	280	285
Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro		
290	295	300
Ser Thr		

<210> 15

<211> 367

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-89

<400> 15

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu

20 25 30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu

35 40 45

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu

50 55 60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln

65 70 75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp

80 85 90

Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe

95 100 105

Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg

110 115 120

Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp

125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg		
275	280	285
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp		
290	295	300
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val		
305	310	315
Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp		

320 325 330
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gin Pro Gly Thr Asp Tyr
335 340 345
Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro
350 355 360
Val Val Ile Asp Ala Ser Thr
365

<210> 16

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-90

<400> 16

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
1 5 10 15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
20 25 30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
35 40 45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
50 55 60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
65 70 75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
80 85 90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
95 100 105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
110 115 120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
125 130 135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
140 145 150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg
155 160 165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
170 175 180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
185 190 195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
200 205 210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
215 220 225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
230 235 240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
245 250 255

Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
260 265 270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn
275 280 285
Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp
290 295 300
Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu
305 310 315
Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro
320 325 330
Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu
335 340 345
Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu
350 355 360
Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
365

<210> 17

<211> 370

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-92

<400> 17

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu

20 25 30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu

35 40 45

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu

50 55 60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln

65 70 75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp

80 85 90

Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe

95 100 105

Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg

110 115 120

Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp

125 130 135

Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr

140 145 150

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg

155 160 165

Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp

170 175 180

Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu

185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp		
275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp		
290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr		
305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro		
320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys		
335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg		
350	355	360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu		
365	370	

<210> 18

<211> 457

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-179

<400> 18

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1														15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
														30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
														45
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
														60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
														75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
														90
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
														105
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
														120
110														

Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
125 130 135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
140 145 150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg
155 160 165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
170 175 180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
185 190 195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
200 205 210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
215 220 225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
230 235 240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
245 250 255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
260 265 270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg
275 280 285
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp
290 295 300
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val
305 310 315

Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp
320 325 330
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr
335 340 345
Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro
350 355 360
Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu
365 370 375
Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln
380 385 390
Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys
395 400 405
Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly
410 415 420
Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr
425 430 435
Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro
440 445 450
Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
455

<210> 19

<211> 459

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-181

<400> 19

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
1 5 10 15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
20 25 30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
35 40 45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
50 55 60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gin
65 70 75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gin Lys Thr Gly Leu Asp
80 85 90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
95 100 105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
110 115 120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
125 130 135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
140 145 150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg

155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp		
275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp		
290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr		
305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro		
320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys		
335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg		

350 355 360
Pro Ala Gin Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro
365 370 375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile
380 385 390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gin Val Asp
395 400 405
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gin Thr Pro Ile Gin Arg Thr Ile Lys
410 415 420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gin Pro Gly Thr
425 430 435
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser
440 445 450
Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr
455

<210> 20

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named H-275-Cys

<400> 20

Met Ala Ala Ser Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr
1 5 10 15
Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn
20 25 30
Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys
35 40 45
Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser
50 55 60
Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser
65 70 75
Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly
80 85 90
Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg
95 100 105
Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr
110 115 120
Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala
125 130 135
Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg
140 145 150
Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile
155 160 165
Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val
170 175 180
Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe
185 190 195

Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro
200 205 210
Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly
215 220 225
Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr
230 235 240
Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile
245 250 255
Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile
260 265 270
Gly Arg Lys Lys Thr Cys
275

<210> 21

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 12S

<400> 21

aaaccatggc agcttagcgct attcctgcac caactgac 38

<210> 22

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 14A

<400> 22

aaaggatccc taactagtc tttccttcc aatcag 36

<210> 23

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer Cys-A

<400> 23

aaaagcggcc gctagcgcaa gccatggctc gtttcctgtg 40

<210> 24

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer Cys-S

<400> 24

aaaagcggcc gcactagtgc atagggatcc ggctgagcaa c 41

<210> 25

<211> 658

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CH-296Na

<400> 25

Met Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val

20 25 30

Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile

35 40 45

Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr

50 55 60
Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr
65 70 75 80
Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile
85 90 95
Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala
100 105 110
Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His
115 120 125
Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser
130 135 140
Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile
145 150 155 160
Val Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln
165 170 175
Ser Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
180 185 190
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg
195 200 205
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
210 215 220
Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
225 230 235 240
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
245 250 255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

260 265 270
Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gin Met Gin Val Thr Asp Val Gin Asp Asn
275 280 285
Ser Ile Ser Val Lys Trp Leu Pro Ser Ser Ser Pro Val Thr Gly Tyr
290 295 300
Arg Val Thr Thr Pro Lys Asn Gly Pro Gly Pro Thr Lys Thr Lys
305 310 315 320
Thr Ala Gly Pro Asp Gin Thr Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gin Pro
325 330 335
Thr Val Glu Tyr Val Val Ser Val Tyr Ala Gin Asn Pro Ser Gly Glu
340 345 350
Ser Gin Pro Leu Val Gin Thr Ala Val Thr Ala Ile Pro Ala Pro Thr
355 360 365
Asp Leu Lys Phe Thr Gin Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gin Trp
370 375 380
Thr Pro Pro Asn Val Gin Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro
385 390 395 400
Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser
405 410 415
Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val
420 425 430
Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gin Gly
435 440 445
Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val
450 455 460
Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr

465 470 475 480
Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln
485 490 495
Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile
500 505 510
Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu
515 520 525
Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala
530 535 540
Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser
545 550 555 560
Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile
565 570 575
Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg
580 585 590
Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly
595 600 605
Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser
610 615 620
Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val
625 630 635 640
Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro
645 650 655
Ser Thr

<210> 26

<211> 1989

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide coding CH-296Na

<400> 26

catatgcccc	ctgacacctg	cg	attcaccaac	attgggtcc	ag	acaccatgc	gtgtcacctgg	60
gctccacccc	catccattga	tttaaccaac	ttccctgg	gttactcg	cc	tgtgaaaat		120
gaggaagatg	ttgcagagtt	gtcaatttct	ccttcagaca	atgcagtgg	t	cttaacaaat		180
c	ctcc	tgcctg	gtacagaata	tgtatgt	gtgtcc	atgt	acatgagagc	240
acac	cttta	gaggaagaca	gaaaacagg	ttgtatccc	caactgg	cat	tgactttct	300
gatattactg	ccaactctt	tactgt	gtcac	tggattg	ctcgag	ccac	catca	360
tacaggatcc	gccatcatcc	cgagcacttc	agtgggagac	ctcgaga	aga	tcggg	tgccc	420
cact	ctcg	ga	attccatcac	cctcaccaac	c	tcactcc	ag	480
atcg	ttg	ctc	ttaatggc	agaggaa	at	cccttatt	tg	540
tctgatgtt	c	cgagggac	ctt	ggtt	gtgc	gaccc	ccacc	600
tggatg	ctg	ctgt	tcac	gtgagat	tacaggat	ca	ttacgg	660
aatagcc	ctg	tcc	aggag	ttt	ctt	acgg	acat	720
cttaaac	ctg	gagtt	gatta	tacat	actgt	gtc	catc	780
cccgca	gca	aa	ggcca	ttc	ccat	ggcc	atc	840
atgca	aa	gtt	ccgatgttca	ggaca	acagc	at	tggt	900
cctgtt	act	gtt	tttca	acc	accact	ccc	aaaaat	960
acc	acc	act	tttca	acc	accact	ccc	aaaaat	

aaaactgcag gtccagatca aacagaaaatg actattgaag gcttgcagcc cacagtggag	1020
tatgtggta gtgttatgc tcagaatcca agcggagaga gtcagccctt gttcagact	1080
gcagtaaccg ctattccatgc accaactgac ctgaagttca ctcaggtcac acccacaagc	1140
ctgagcgccc agtggacacc acccaatgtt cagctactg gataatcgagt gcgggtgacc	1200
cccaaggaga agaccggacc aatgaaagaa atcaaccttg ctccctgacag ctcatccgt	1260
gttgtatcg gacttatggt ggccacccaa tatgaagtga gtgttatgc tcttaaggac	1320
actttgacaa gcagaccgc tcaggggtt gtcaccactc tggagaatgt cagccccacca	1380
agaagggctc gtgtacaga tgctactgag accaccatca ccattagctg gagaaccaag	1440
actgagacga tcactggctt ccaagtttat gccgttccag ccaatggcca gactccaatc	1500
cagagaacca tcaagccaga tgcagaagc tacaccatta caggtttaca accaggcact	1560
gactacaaga tctacctgta caccttgaat gacaatgctc ggagctcccc tgggtcatc	1620
gacgcctcca ctgccattga tgcaccatcc aacctgcgtt tccctggccac cacacccaaat	1680
tccttgctgg tatcatggca gcccacgt gccaggatta cggctacat catcaagtat	1740
gagaaggctg ggtctccctcc cagagaatgt gtccctcgcc cccgcccgg tgcacagag	1800
gctactatta ctggccctgga accgggaacc gaatatacaa tttatgtcat tccctgaag	1860
aataatcaga agagcgagcc cctgatttggaa aggaaaaaga cagacgagct tccccaactg	1920
gttaacccttc cacacccaa tcttcatggaa ccagagatct tggatgttcc ttccacataa	1980
tagaagctt	1989

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer CH-296Na1

<400> 27

atcatatgcc cactgacctg cg

22

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer CH-296Na2

<400> 28

ataagcttct attatgtgga agg

23

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer CH-296Na3

<400> 29

accatcactg gctacaggat cc

22

4 6 / 4 6



P.B.5818 - Patentlaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
T (070) 3 40 20 40
FAX (070) 3 40 30 16

Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Generaldirektion 1

Directorate General 1

Direction générale 1



HOSODA, Yoshinori
c/o Hosoda International Patent Office
P.O.Box 26, OMM Building 5th Floor
7-31, Otemae 1-chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 540-6591
JAPON

EPO Customer Services

Tel.: +31 (0)70 340 45 00

Date

05.01.06

Reference	Application No./Patent No. 04772194.9 - 2406 PCT/JP2004012238
Applicant/Proprietor TAKARA BIO INC.	

Entry into the European phase before the European Patent Office

These notes describe the procedural steps required for entry into the European phase before the European Patent Office (EPO). You are advised to read them carefully: failure to take the necessary action in time can lead to your application being deemed withdrawn.

1. The above-mentioned international patent application has been given European application No. 04772194.9.
2. Applicants without a residence or their principal place of business in an EPC contracting state may themselves initiate European processing of their international applications, provided they do so before expiry of the 31st month from the priority date (see also point 6 below).

During the European phase before the EPO as designated or elected Office, however, such applicants must be represented by a professional representative (Arts. 133(2) and 134(1), (7) EPC).

Procedural acts performed after expiry of the 31st month by a professional representative who acted during the international phase but is not authorised to act before the EPO have no legal effect and therefore lead to loss of rights.

Please note that a professional representative authorised to act before the EPO and who acted for the applicant during the international phase does not automatically become the representative for the European phase. Applicants are therefore strongly advised to appoint in good time any representative they wish to initiate the European phase for them; otherwise, the EPO has to send all communications direct to the applicant.

3. Applicants with a residence or their principal place of business in an EPC contracting state are not obliged to appoint, for the European phase before the EPO as designated or elected Office, a professional representative authorised to act before the EPO.
However, in view of the complexity of the procedure it is recommended that they do so.
4. Applicants and professional representatives are also strongly advised to initiate the European phase using EPO Form 1200 (available free of charge from the EPO). This however is not compulsory.



5. To enter the European phase before the EPO, the following acts must be performed.
(N.B.: Failure validly to do so will entail loss of rights or other adverse legal consequences.)
 - 5.1 If the EPO is acting as designated or elected Office (Arts. 22(1)(3) and 39(1) PCT respectively), applicants must, within 31 months from the date of filing or (where applicable) the earliest priority date:
 - a) Supply a translation of the international application into an EPO official language, if the International Bureau did not publish the application in such a language (Art. 22(1) PCT and Rule 107(1)(a) EPC).
If the translation is not filed in time, the international application is deemed withdrawn before the EPO (Rule 108(1) EPC).
This loss of rights is deemed not to have occurred if the translation is then filed within a two-month grace period as from notification of an EPO communication, provided a surcharge is paid at the same time (Rule 108(3) EPC).
 - b) Pay the national basic fee (EUR 160,00) and, where a supplementary European search report has to be drawn up, the search fee (EUR 960,00 ; Rule 107(1)(c) and (e) EPC).
 - c) If the time limit under Article 79(2) EPC expires before the 31-month time limit, pay the designation fee (EUR 75,00) for each contracting state designated (Rule 107(1)(d) EPC).
 - d) If the time limit under Article 94(2) EPC expires before the 31-month time limit, file the written request for examination and pay the examination fee (EUR 1430,00 ; Rule 107(1)(f) EPC).
 - e) Pay the third-year renewal fee (EUR 380,00) if it falls due before expiry of the 31-month time limit (Rule 107(1)(g) EPC).

If the fees under (b) to (d) above are not paid in time, or the written request for examination is not filed in time, the international application is deemed withdrawn before the EPO, or the contracting-state designation(s) in question is (are) deemed withdrawn (Rule 108(1) and (2) EPC). However, the fees may still be validly paid within a two-month grace period as from notification of an EPO communication, provided the necessary surcharges are paid at the same time (Rule 108(3) EPC). For the renewal fee under (e) above, the grace period is six months from the fee's due date (Article 86(2) EPC).
 - 5.2 If the application documents on which the European grant procedure is to be based comprise more than ten claims, a claims fee is payable within the 31-month time limit under Rule 107(1) EPC for the eleventh and each subsequent claim (Rule 110(1) EPC). The fee can however still be paid within a one-month grace period as from notification of an EPO communication pointing out the failure to pay (Rule 110(2) EPC).
6. If the applicant had a representative during the application's international phase, the present notes will be sent to the representative, asking him to inform the applicant accordingly.

All subsequent communications will be sent to the applicant, or - If the EPO is informed of his appointment in time - to the applicant's European representative.



7. For more details about time limits and procedural acts before the EPO as designated and elected Office, see the EPO brochure

How to get a European patent
Guide for applicants - Part 2
PCT procedure before the EPO - "Euro-PCT"

This brochure, the list of professional representatives before the EPO, Form 1200 and details of the latest fees are now all available on the Internet under

<http://www.european-patent-office.org>

RECEIVING SECTION

